

Aus dem Orthopädisch-Unfallchirurgischen Zentrum (OUZ)
der Universitätsmedizin Mannheim
(Prof. Dr. Udo Obertacke MME)

Auswirkungen der Blutsperre-Anwendung während
primärer Knie-Totalendoprothesenimplantation
auf das Ubiquitin-Proteasomen-System

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Stephan Hermanns

aus
Rosenheim
2017

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Udo Obertacke
Korreferent: N. N.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 EINLEITUNG	3
2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Patientenauswahl und Muskelprobengewinnung	9
2.2 Verwendete Materialien.....	12
2.2.1 Chemikalien.....	12
2.2.2 Geräte und Utensilien	12
2.2.3 Software	12
2.2.4 Hergestellte Lösungen.....	12
2.3 Labormethodik	13
2.3.1 Proteinextraktion.....	13
2.3.2 Proteinbestimmung.....	13
2.3.3 Proteasomenaktivitätsbestimmung	13
2.3.4 Ubiquitinierungsreaktion	15
2.3.5 (Polyacrylamid-) Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	16
2.3.6 Western-Blot.....	16
2.3.7 Dokumentation und Auswertung	17
2.3.8 Western-Blot Kontrolle - Anfärbung des Gels	17
2.3.9 Western-Blot Stripping - Entfernung des Antikörpers von der Membran ..	18
2.3.10 Untersuchung des endogenen Ubiquitins	18
2.4 Statistische Auswertung	19
3 ERGEBNISSE	20
3.1 Klinische Daten der Studienpatienten.....	20
3.2 Studienarm A mit Blutsperre.....	20
3.2.1 Ubiquitinierungsaktivität.....	20

3.2.2	Proteasomenaktivität	24
3.2.3	Endogenes Ubiquitin	29
3.3	Studienarm B ohne Blutsperre	32
3.3.1	Ubiquitinierungsaktivität.....	32
3.3.2	Proteasomenaktivität	35
3.3.3	Endogenes Ubiquitin	40
3.4	Vergleich der Studienarme	43
3.4.1	Ubiquitinierungsaktivität.....	43
3.4.2	Proteasomenaktivität	44
3.4.3	Endogenes Ubiquitin	48
4	DISKUSSION	50
5	ZUSAMMENFASSUNG	57
6	ANHANG	58
6.1	Chemikalien	58
6.2	Geräte und Utensilien.....	60
6.3	Software.....	61
6.4	Hergestellte Lösungen	62
7	LITERATURVERZEICHNIS	64
8	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	72
9	LEBENS LAUF	73
10	DANKSAGUNG.....	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADA	Adenosin-Desaminase
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
ASA	American Society of Anesthesiologists
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTE	Dithioerythritol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitylating enzymes
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f	Femto
g	Gramm
h	Stunde
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
ICD	Internal Cardioverter Defibrillator
IgG	Immunglobulin der Klasse G
kat	Katal
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
m	Milli, 10^{-3}
M	Molarität
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MES	Morpholinoethansulfonsäure

MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OP	Operation
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
pH	potentia Hydrogenii
PVDF	Polyvinylidenfluorid
s	Sekunde
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium dodecyl sulfat
tUbPL	total ubiquitin protein ligation rate (Gesamtubiquitinierungsrate)
TEP	Totalendoprothese
Ub	Ubiquitin
Ub _b	Biotinyliertes / Biotinmarkiertes Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System

1 EINLEITUNG

Die Knieendoprothetik ist eine der am häufigsten durchgeführten Verfahren zur Behandlung einer schweren mit starken Schmerzen einhergehenden Gonarthrose. Jährlich werden rund 131.000 (2014) primäre Knie-Totalendoprothesen (Knie-TEP) in Deutschland implantiert [1].

Bei der operativen Behandlung der Gonarthrose mittels Knie-TEP wird die tibio-femorale und in bestimmten Fällen auch die patellofemorale Gelenkoberfläche ersetzt. Der Standardzugang für diese Operation ist die anteromediale parapatellare Arthrotomie. Grundlage für eine korrekte Indikationsstellung sind eine ausführliche Anamnese mit Erfassung der gebrauchsmindernden Beschwerden des Patienten, die körperliche Untersuchung sowie die apparative Diagnostik. Als Indikation für die Implantation einer Knie-TEP zählen die primäre oder sekundäre Gonarthrose mit einhergehenden starken Schmerzen, Instabilität und Bewegungseinschränkung [94]. Radiologische Zeichen einer Gelenkdegeneration (Arthrose) sind Gelenkspaltverschmälerung, Osteophyten, subchondrale Sklerose, Geröllzysten, und Gelenkdeformierung. Für die Knie-TEP besteht die Indikation bei symptomatischer, gebrauchsmindernder bi- oder trikompartimenteller Gonarthrose [80].

Kontraindikationen für den Einbau einer Knie-TEP sind u.a. Kniegelenkempyeme, Hautläsionen, fehlende Narkosefähigkeit und eine asymptomatische Gonarthrose. Zu den Totalendoprothesen zählen neben den achsgeführten Totalendoprothesen die ungekoppelten Oberflächenersatzprothesen. Abhängig von der Stabilität des Kapsel-Band-Apparats erfolgt die Entscheidung zur Implantation einer ungekoppelten oder achsgeführten Knie-TEP.

Bei nicht intaktem bzw. insuffizientem hinteren Kreuzband besteht die Möglichkeit der Implantation einer das hintere-Kreuzband-ersetzenden Prothese, die das Kniegelenk durch höhere Konformität der Komponenten in sagittaler Ebene stabilisiert. Achsgeführte Knie-TEPs werden hauptsächlich bei Revisionseingriffen eingesetzt. Das Tibiaplateau und das Femurschild werden aus Metall, das dazwischenliegende Inlay aus Polyethylen (PE) gefertigt. Bei der Implantation von zementfreien Knie-TEPs besteht eine höhere Lockerungsrate mit einer Revisionsrate von 8,3 % über einen Zeitraum von 10,5 Jahren im Vergleich zum zementierten Prothesendesign mit 3,6 %

[50]. Der aus Polymethylmethacrylat bestehende Zement kann zusätzlich mit Antibiotika angereichert werden, was bei speziellen Indikationen Anwendung findet.

Zu den Intraoperativen Komplikationen zählen Verletzungen von Nerven, Gefäßen, der Seitenbänder, und des hinteren Kreuzbandes, periprothetische Frakturen und die Avulsion des Ligamentum patellae. Weitere Komplikationen sind postoperative Nachblutungen, Fehlpositionierung (Rotations-, Achsenabweichung), eine frühe Lockerung, Fehldimensionierung, Materialermüdung, Infektionen, Wundheilungsstörungen, und Allergien gegen das Implantatmaterial oder den Knochenzement [80], sowie der bereits früh- bzw. mittelfristig einsetzende Abrieb und Verschleiß der Prothese.

Die Nachbehandlung nach Knie-TEP sieht eine schmerzadaptierte Vollbelastung der operierten Extremität an zwei Unterarmgehstützen, eine physiotherapeutische Beübung zur Optimierung des Bewegungsausmaßes (mindestens 90° Flexion) und eine Lymphdrainage vor [77].

Revisionseingriffe werden durchschnittlich in 4,4 % der Fälle innerhalb von 10,7 Jahren notwendig. Die häufigsten Gründe für eine Revision sind aseptische Lockerungen (31 %), gefolgt von Infektionen (23 %), Synovialitis durch Polyethylenabrieb (16 %), patellofemoral-assoziierte Beschwerden (14 %), mechanische Komplikationen (9 %) und sonstige Ursachen (7 %) [50].

Trotz der hohen Erfolgsraten hinsichtlich der Schmerzreduktion, ist das funktionelle Ergebnis stark abhängig von der postoperativen Wiederherstellung der Muskelmasse und der Muskelkraft der unteren Extremität, insbesondere des Musculus quadriceps femoris [58, 74]. Frühere Studien zeigen, dass Patienten nach Knie-TEPs Schwierigkeiten haben, Muskelvolumen und Kraft wieder aufzubauen [10, 18, 57, 58, 88, 97]. Eine Schwäche des Musculus quadriceps nach Knie-TEP führt zu einer wesentlichen funktionellen Beeinträchtigung des Kniegelenks bei alltäglichen Aktivitäten [58]. Eine aktuelle randomisierte klinische Studie [10] zeigt, dass die Verwendung einer Blutsperre im Rahmen der Implantation einer Knie-TEP die Muskelkraft des Musculus quadriceps femoris innerhalb der ersten drei postoperativen Monate negativ beeinflusst. Die Autoren gingen hierbei von multifaktoriellen Ursachen aus, u.a. ischämiebedingt aber auch Folge von Druckschäden an Muskel- und Nervenzellen.

Ohnehin kontrovers diskutiert in der aktuellen Literatur wird die Frage nach der Verwendung einer Blutsperre bei Operationen an den Extremitäten [96]. Oftmals wird bei der Knie-TEP Implantation eine Blutsperre zur besseren Darstellung anatomischer Strukturen im Operationsgebiet, einer Verbesserung der Implantat-Knochen-Zementierung, einer Reduzierung des Blutverlustes, sowie zur Verkürzung der Operationszeit verwendet [13, 96]. Dazu wird eine pneumatische Manschette (Tourniquet) um den Oberschenkel der zu operierenden Seite angelegt und zum vom Operateur gewünschten Zeitpunkt auf den vorgegebenen Manschettendruck aufgeblasen. Bezüglich der Höhe des zu wählenden Manschettendruckes finden sich in der Fachliteratur unterschiedliche Angaben und Verfahren. Zu den gängigsten Verfahren zählt die Verwendung von fest definierten Manschettendrücken (meist 200 - 250 mmHg am Oberarm und 300 - 350 mmHg am Oberschenkel) [9, 36] bzw. an den systolischen Blutdruck des Patienten adaptierte Drücke.

Die Verwendung der Blutsperre bei orthopädischen Operationen führt neben druckbedingter Nerven- und Muskelzellschädigung auch zu einer Skelettmuskelischämie, welche eine Oxidation von Muskelproteinen einschließlich der funktionell essentiellen kontraktilen Proteine Myosin und Aktin zur Folge hat ¹ [23, 74]. Dieser u.a. durch Ischämie induzierte Muskelproteinabbau könnte zu einer klinisch manifesten Muskelatrophie führen [56]. Eine Tourniquet-induzierte Muskel-Ischämie bei der Implantation einer Knie-TEP und die unmittelbaren Auswirkungen auf die menschlichen Skelettmuskelzellen waren in der Literatur kaum dokumentiert [74, 90]. Das wissenschaftliche Interesse bezüglich der Auswirkungen der Ischämie auf den Skelettmuskelmetabolismus waren hauptsächlich auf systemische Erkrankungen als Ursache fokussiert [26, 51, 52, 69, 93].

Der reguläre Proteinumsatz und der Abbau beschädigter Proteine der Skelettmuskulatur wird von mehreren proteolytischen Systemen reguliert welche miteinander interagieren [63]. Sie lassen sich in Proteasomen-unabhängige und

¹ Weitere negative Effekte welche in der Literatur beschrieben werden, sind ein erhöhter post- bzw. perioperativer operativer Blutverlust, ein höheres Risiko für thromboembolische Komplikationen (z.B. tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien), Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen, sowie ein vermehrtes subjektives Schmerzempfinden, ein erhöhter Schmerzmittelverbrauch innerhalb der frühen postoperativen Phase (1.– 4. Stunde), ein längerer Krankenhausaufenthalt, eine schlechtere postoperative Beugefähigkeit, sowie eine langsamere funktionelle Erholung postoperativ [13, 14, 35, 45, 96].

Proteasomen-abhängige Systeme einteilen. Zu den Proteasomen-unabhängigen Systemen zählen die Lysosomen, die calciumabhängigen Calpaine, sowie die Cysteinproteasen. Der Proteasomen-abhängige Proteinabbau erfolgt ATP-abhängig durch das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS). Das UPS ist einer der Hauptstoffwechselwege zum Abbau von Skelettmuskelproteinen [5, 8].

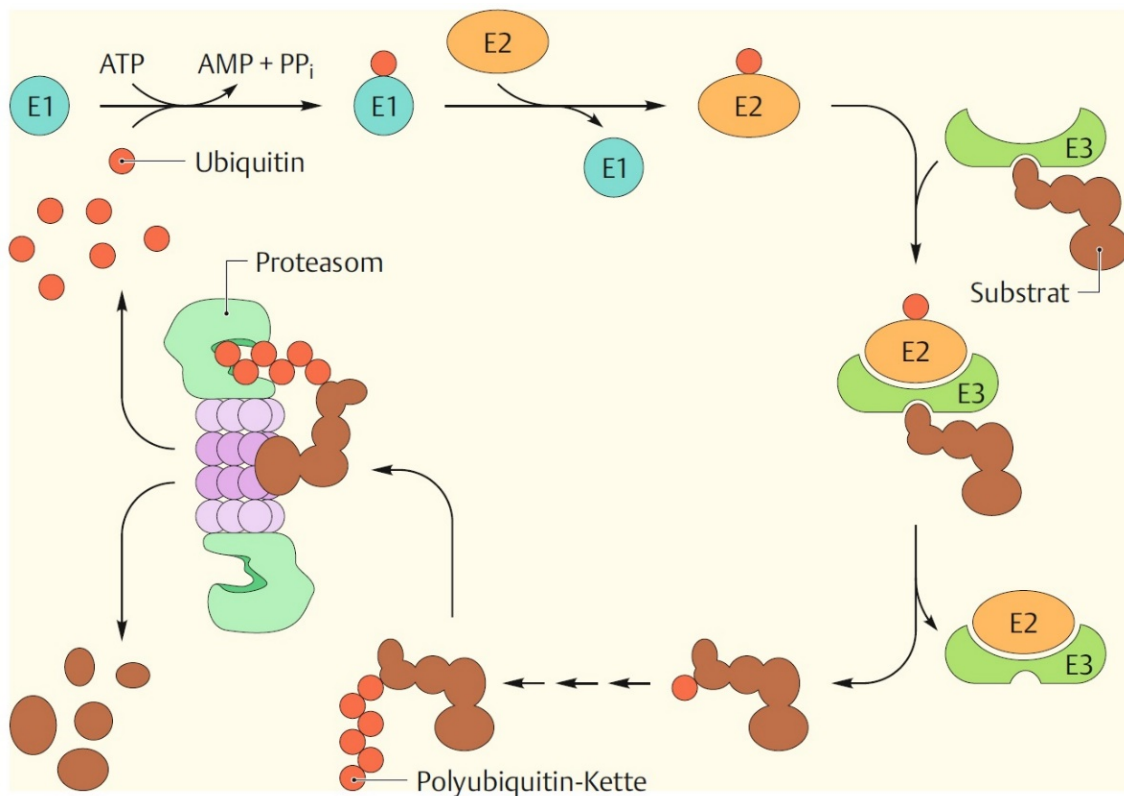
Verschiedene Studien u.a. von Seiffert et al. [82] haben bereits gezeigt dass unter katabolen Stoffwechselbedingungen, wie z.B. im Rahmen einer Sepsis oder metabolischer Azidose, bei Tumorerkrankungen, erhöhten Glukokortikoidspiegeln, nach Traumata, Verbrennungen oder beim Fasten das UPS zum Abbau von beschädigten Muskelproteinen durch gesteigerte Expression von Ub, C-mRNA und Proteasomen-Untereinheiten-kodierender mRNA hochreguliert wird, was unter bestimmten Umständen zum Verlust von Muskelmasse führen kann [24, 25, 34, 95]. Neben der Konzentration an mRNA spielen aber auch Insulin, Glukokortikoide und zahlreiche Cytokine wie z.B. IFN- γ , IGF-1, IL-1, IL-6, und TNF- α bei der Regulation des UPS eine Rolle [6, 24, 25, 28].

Das Ubiquitin (Ub) ist ein hochkonserviertes Polypeptid, bestehend aus 76 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 8,5 kDa, welches in allen eukaryoten Zellen vorkommt und durch verschiedene Gene exprimiert wird [19, 82, 91]. Für die Proteolyse durch das UPS werden die abzubauenen Proteine zuerst mit einer aus mehreren Ub-Molekülen bestehenden Ub-Kette konjugiert. Die Konjugation erfolgt in mehreren aufeinander folgenden Schritten, welche durch die Ubiquitin aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzyme E1, E2 und E3 vermittelt werden (siehe Abbildung 1.1) [27, 31, 59].

Im ersten Schritt wird ein Ub-Molekül unter ATP-Verbrauch und kovalenter Bindung an das „Ubiquitin-activating-enzyme E1“ aktiviert und für die Bindung an das zur Proteolyse vorgesehene Protein vorbereitet [27, 30]. Im nächsten Schritt kommt es zur Übertragung des Ub-Moleküls vom E1-Enzym auf eines der „Ubiquitin-conjugating-enzymes E2“ [89]. Als letztes kommt es dann zur Komplexbildung zwischen dem mit Ub konjugierten E2-Enzym und dem „Ubiquitin-protein-ligase E3“-Enzym welches für die korrekte Erkennung des abzubauenen Proteins zuständig ist. Durch die Komplexbildung kann das Ub-Molekül entweder direkt per kovalenter Bindung auf das

abzubauen. Protein übertragen werden (z.B. durch E3-Enzyme der RING-Familie) oder in einem Zwischenschritt erst eine Bindung mit dem Enzym E2 eingehen bevor es auf das Protein übertragen wird (z.B. durch E3-Enzyme der HECT-Familie) [16, 20]. Zur Bildung einer Poly-Ub-Kette wird der Vorgang wiederholt. Zur Regulation kann ein „Ubiquitin Chain Assembly Factor E4“-Enzym an dieser Reaktion beteiligt sein [38, 75].

Abbildung 1.1: Ablauf der Markierung von für die Proteolyse vorgesehener Proteine mit Ubiquitin (Rassow et.al., Biochemie, Duale Reihe, 3.Auflage, 2012, Georg Thieme Verlag, Seite 375)



Für die Erkennung und die Degeneration durch das 26S-Proteasom müssen die abzubauenen Proteine mit einer aus mindestens 4 Ub-Molekülen bestehenden Poly-Ub-Kette konjugiert sein da sonst die Affinität zum Proteasom zu gering ist [86]. Das 26S Proteasom ist ein hoch entwickelter ATP-abhängiger Proteasekomplex für den Abbau von mit Poly-Ub-Ketten markierter intrazellulärer Proteine [27]. Es besteht aus einem proteolytischen Kern (20S-Proteasom) und zwei regulatorischen Einheiten (19S-Komplexe) [40]. Die Aufgabe der 19S-Einheiten ist die Erkennung der abzubauenen mit Poly-Ub-Ketten markierten Proteine, sowie die Entfaltung und Einschleusung in den proteolytischen Kern der 20S-Einheit [42]. Nach Abspaltung der

Poly-Ub-Kette durch die 19S-Einheit erfolgt dann die Proteolyse im Inneren des 20S Proteasoms [70, 92]. Hierfür besitzt das Proteasom drei ATP-abhängige Peptidase-aktivitäten (chymotryptische, tryptische und peptidyl-glutamyl-peptid-hydrolysierende Aktivität) [4]. Die abgespaltenen Poly-Ub-Ketten werden durch sogenannte „Deubiquitylating enzymes“ (DUBs) wieder in einzelne freie Ub-Moleküle aufgespalten um dann der Zelle erneut zur Verfügung zu stehen [32].

Zum Zeitpunkt der Studienplanung (2012) existierten keine weiteren Studien welche die Rolle des UPS bei Blutsperre induzierter Muskelischämie während der Implantation einer Knie-TEP analysierten.

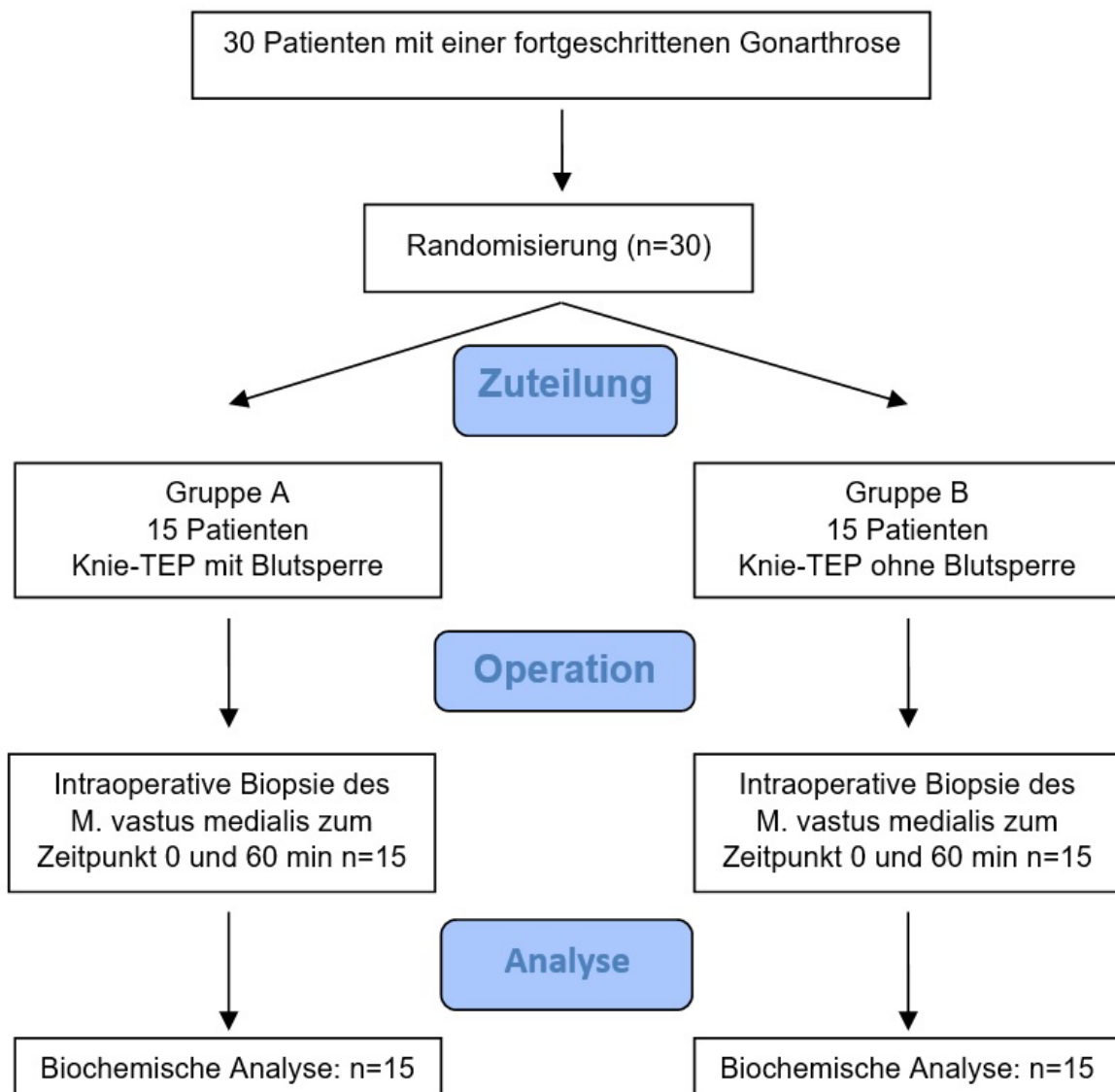
Daher war das Ziel der vorliegenden Studie, die Auswirkung der durch die Blutsperre-Anwendung verursachten 60-minütigen Hypoxie in den Zellen des Musculus vastus medialis während Knie-TEP Operationen auf das UPS anhand der Konzentrationen von freiem bzw. konjugiertem Ubiquitin, der Ubiquitinierungsrate, sowie der Proteasomen-abhängigen und -unabhängigen Peptidaseaktivitäten zu quantifizieren.

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenauswahl und Muskelprobengewinnung

Um die Auswirkungen der Blutsperre auf das Ubiquitin-Proteasomen-System untersuchen zu können, wurden insgesamt 30 Patienten, die auf zwei Studienarme á 15 Patienten zufällig verteilt wurden, untersucht. Alle Studienteilnehmer waren Gonarthrose-Patienten des Orthopädisch-Unfallchirurgischen Zentrums des Universitätsklinikums Mannheim. Die 15 Patienten des Studienarms A bekamen eine Knie-Totalendoprothese mit Blutsperre, die des Studienarms B eine Knie-TEP ohne Blutsperre (siehe *Abbildung 2.1*).

Abbildung 2.1: Studienablauf



Im Rahmen der Studienplanung erfolgte eine Fallzahlabeschätzung durch die Abteilung für medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung an der Medizinischen Fakultät Mannheim. Die Power-Analyse (a priori) wurde auf der Grundlage von zuvor veröffentlichter Daten durchgeführt [82]. Für eine Power von 0,8 war eine Gesamtprobengröße von 30 Patienten erforderlich (15 für jede Gruppe), um signifikante Unterschiede zu erkennen. Das gesamte Studienkollektiv bestand daher aus insgesamt 30 (16 weiblichen und 14 männlichen) Patienten mit Gonarthrose, im Alter von $70,29 \pm 6,83$ Jahren (MW \pm SD) und einem BMI von $32,90 \pm 5,19$ (MW \pm SD). Die Therapie bestand bei allen Patienten aus einem operativen Einbau einer Knie-Totalendoprothese.

Durch die im Studienprotokoll festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien sollte ein möglichst homogenes Patientenkollektiv für die Studie ausgewählt werden, ohne signifikante Unterschiede in den beiden Studienarmen. Die Einschlusskriterien (siehe *Tabelle 2.1*) für Studienpatienten waren ein Alter zwischen 55 und 85 Jahren, ein BMI $<45 \text{ kg/m}^2$, eine dritt- oder viertgradige Gonarthrose nach Kellgren und Lawrence [37], ein Gesundheitsstatus der ASA I oder II [11] erfüllt, und eine volle Geschäftsfähigkeit.

Tabelle 2.1: Einschlusskriterien für Studienpatienten

Alter zwischen 55 und 85 Jahren
BMI $<45 \text{ kg/m}^2$
3./4. gradige Gonarthrose
Gesundheitsstatus ASA I-II
volle Geschäftsfähigkeit

Zu den Ausschlusskriterien (siehe *Tabelle 2.2*) für Studienpatienten zählten ein Alter unter 55 und über 85 Jahren, eine aktuell bösartige Erkrankung, eine schwere systemische Erkrankungen (ASA III-IV), eine erst- oder zweitgradige Gonarthrose, eine Erkrankung des rheumatischen Formenkreises, eine infektiöse Erkrankung, keine Geschäftsfähigkeit, ein Revisionseingriff, ein BMI $>45 \text{ kg/m}^2$, eine tiefe Beinvenenthrombose in der Anamnese, eine symptomatische periphere arterielle Verschlusskrankheit an der operierten Extremität, die Einnahme von Glukokortikoiden, Antikoagulantien (u.a. Cumarine, Heparine) und nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR u.a. ASS), ein immunsuppressiver Zustand (z.B. durch Einnahme von Zytostatika oder HIV-Infektion), eine Gerinnungsstörung, eine Leberfunktionsstörung, eine präoperativ

bekannte neurologische Störung, eine präoperativ bekannte Immobilität, eine Koronargefäßerkrankung und ICD-Träger.

Tabelle 2.2: Ausschlusskriterien für Studienpatienten

Alter <55 und >85 Jahren
aktuell bösartige Erkrankung
schwere systemische Erkrankungen (ASA III-IV)
1./2. gradige Gonarthrose
Erkrankung des rheumatischen Formenkreises
infektiöse Erkrankung
keine Geschäftsfähigkeit
Revisionseingriff
BMI >45 kg/m ²
anamnestisch tiefe Beinvenenthrombose
symptomatische pAVK
Einnahme von Glukokortikoiden/Antikoagulantien/NSAR
immunsuppressiver Zustand
Gerinnungsstörung
Leberfunktionsstörung
präoperativ bekannte neurologische Störung
präoperativ bekannte Immobilität
Koronargefäßerkrankung
ICD-Träger

Tabelle 2.3: Dokumentierte Daten pro Studienpatienten

Geschlecht (weiblich/männlich)
Alter (Jahre)
Größe (cm)
Gewicht (kg)
BMI
Op-Seite (links / rechts)
Operationsdauer (min)
Zeit zwischen 1. und 2. Probenentnahme (min)
Blutverlust (intra- und postoperativ)
Anästhesieform (Vollnarkose / Spinalanästhesie)
Dauermedikation
Intraoperative Medikation
Vorerkrankungen

Desweiteren wurden zu jedem Studienpatienten folgende Daten dokumentiert: Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, BMI, OP-Seite, Operationsdauer, intra- und

postoperativer Blutverlust, Art der Narkose, Dauermedikation, intraoperative Medikation, Vorerkrankungen (siehe *Tabelle 2.3*).

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Mannheim genehmigte das Studienprotokoll (Aktenzeichen: 2012-334N-MA). Die Studienpatienten wurden präoperativ in einem ärztlichen Gespräch über die Studie aufgeklärt. Die Patienten bestätigten ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie schriftlich. Die Einwilligung ist Bestandteil der Patientenakte.

Während der Operation entnahm der Operateur kurz nach (3 min) Beginn des Eingriffs eine etwa 100 mm³ große Probe von quergestreifter Skelettmuskulatur des Musculus vastus medialis. Die Muskelprobe wurde direkt nach der Entnahme in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Eine zweite Probe wurde 60 min nach Entnahme der ersten Biopsie, 1-2 cm proximal der ersten Entnahmestelle im Musculus vastus medialis, entnommen und auch direkt nach der Entnahme in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung im Rahmen der Versuchsreihe blieben die Muskelproben in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2 Verwendete Materialien

2.2.1 Chemikalien

Siehe Anhang 6.1

2.2.2 Geräte und Utensilien

Siehe Anhang 6.2

2.2.3 Software

Siehe Anhang 6.3

2.2.4 Hergestellte Lösungen

Siehe Anhang 6.4

2.3 Labormethodik

2.3.1 Proteinextraktion

Von den in flüssigem Stickstoff archivierten Skelettmuskelbiopsien wurden 90-120 mg große Muskelstücke abgeschnitten, mit einer Feinwaage gewogen, und im Homogenisator in 250 µl Lysepuffer für 5 min auf Eis inkubiert. Der restliche Teil der Biopsie wurde wieder in flüssigem Stickstoff archiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte eine mechanische Homogenisierung der Muskelprobe mit 10 Schüben, und einer Zwischenlagerung auf Eis für 30 s. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das homogenisierte Lysat wurde dann in der Ultrazentrifuge 30 min bei 4 °C und 40.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und für den nächsten Arbeitsschritt, die Proteinbestimmung, auf Eis gelagert.

2.3.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge im Muskellysat wurde nach dem Prinzip von Lowry [49] mit dem DC Protein Assay der Firma Bio-Rad und dem Gerät GENios der Firma TECAN durchgeführt. Es wurden dafür nach Herstellerprotokoll jeweils in doppelter Ausführung der Proteinstandard in sechs unterschiedlichen Verdünnungen sowie das Muskellysat in den Verdünnungen 1:20 und 1:50 auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Es wurde dann eine Absorptionsmessung mit dem Microplatereader GENios bei einer Längenwelle von 650nm durchgeführt. Aus den daraus folgenden Absorptionswerten wurde dann die Proteinkonzentration des Muskellysats bestimmt.

2.3.3 Proteasomenaktivitätsbestimmung

Die Proteasomenaktivitätsmessung wurde mit frischem Muskellysat durchgeführt. Pro Ansatz wurde Muskellysat mit einem Gesamtproteingehalt von 15 µg benötigt. Die dafür notwendige Menge an Muskellysat wurde durch die Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 2.3.2) ermittelt. Um zwischen Proteasomen-abhängiger und Proteasomen-unabhängiger Peptidaseaktivität unterscheiden zu können wurde abhängig von der zu untersuchenden hydrolytischen Aktivität, ein spezifischer Proteasomen-Inhibitor hinzugegeben:

- 1-5 μM (Ada-(Ahx)3-(Leu)3-VS) in DMSO
Adamantane-acetyl-(6-aminohexanoyl)3-(leucinyl)3-vinyl-methyl-sulfone
- 0,1-1 μM Epoxomicin in DMSO

Die vollständige Inhibition ist bei beiden Inhibitoren ab einer Konzentration von 10 μM erreicht. Um die verschiedenen hydrolytischen Aktivitäten bestimmen zu können wurden 3 verschiedene Substrate verwendet:

- C-L (Caspase-like) / Proteasom Substrate II:
Z-LLE-AMC (Carbobenzoxy-Leu-Leu-Glu-(7-Amino-4-Methylcoumarin))
in DMSO mit einer Endkonzentration von 100 μM
- CT-L (Chymotrypsin-like) / Proteasom Substrate III:
Suc-LLVY-AMC(N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-(7-Amino-4-Methylcoumarin))
in DMSO mit einer Endkonzentration von 100 μM
- T-L (Trypsin-like) / Proteasom Substrate VI:
Z-ARR-AMC (Carbobenzoxy-Ala-Arg-Arg-(7-Amino-4-Methylcoumarin))
in DMSO mit einer Endkonzentration von 200 μM

Pro Muskelprobe wurden 9 unterschiedliche Ansätze untersucht:

- Proteolyse-Aktivität für Substrat C-L
- Proteolyse-Aktivität für Substrat C-L mit 10 μM Ada
- Proteolyse-Aktivität für Substrat C-L mit 10 μM Ada + 10 mM EDTA
- Proteolyse-Aktivität für Substrat CT-L
- Proteolyse-Aktivität für Substrat CT-L mit 10 μM Epoxomicin
- Proteolyse-Aktivität für Substrat CT-L mit 10 μM Epoxomicin + 10 mM EDTA
- Proteolyse-Aktivität für Substrat T-L
- Proteolyse-Aktivität für Substrat T-L mit 10 μM Ada
- Proteolyse-Aktivität für Substrat T-L mit 10 μM Ada + 10 mM EDTA

Jeder Ansatz wurde noch zweimal wiederholt. Somit wurden insgesamt 27 Ansätze pro Muskelprobe untersucht. Das endgültige Volumen jedes einzelnen Ansatzes

betrug 50 µl. Die proteolytische Aktivität wurde als Mittelwert aus den jeweils drei identischen Ansätzen ermittelt.

Die berechnete Menge an frischem Muskellysat wurde in Proteasomenassay-Puffer verdünnt. Die Ansätze (Proteasomenassay-Puffer, Muskellysat, und Inhibitoren) wurden für 10 min unter RT inkubiert und dann auf die Mikrotiterplatten von Greiner Bio-One (96 Well Polystyrol, F-Boden, Fluotrac 200) pipettiert. EDTA wurde hinzu pipettiert und kurz auf dem Schüttler vermischt. Der Assay wurde durch die Zugabe der speziellen CT-L, T-L und C-L Substrate gestartet.

Das durch die proteolytische Reaktion vom Substrat abgespaltene AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) wurde bei einer Wellenlänge von 465 nm (Anregung bei 360 nm) mit dem MicroplateReader GENios von TECAN gemessen. Die proteolytische Aktivität korreliert mit steigender Fluoreszenz. Nach der Zugabe des Substrates wurde die Fluoreszenz in Intervallen von 15 Minuten für die Dauer von einer Stunde, beginnend zum Zeitpunkt 0 Minuten, gemessen. Aus den daraus folgenden Absorptionswerten wurde dann die proteolytische Aktivität des Muskellysats anhand der Referenzkurve für AMC (Sigma) bestimmt. Die proteolytische Aktivität wurde in [pkat / mg Gesamtprotein] angegeben.

2.3.4 Ubiquitinierungsreaktion

Die Gesamtabiquitinierungsrate (*tUbPL*), also die Geschwindigkeit mit der Proteine kovalent mit Ubiquitin markiert werden, wurde mithilfe einer Enzymkinetik bestimmt. Dafür wurde biotinmarkiertes Ubiquitin dem Muskellysat zugegeben, was unter ATP Verbrauch zur Entstehung von Ub_b-Protein-Konjugaten führt. Um ein möglichst exaktes Ergebnis zu erhalten wurde der Messbereich zwischen drei und neun Minuten definiert, da sich die Enzymkinetik hier annähernd linear verhält [30]. In 10 µl Ansätzen wurde jeweils 30 µg Protein aus dem Muskellysat, 1 mM ATP, 2 µg Ub_b, Reaktionspuffer und H₂O zusammen pipettiert. Für den 0 Minuten Ansatz wurde vor Zugabe des Muskellysats 10 µl Lämmli-Puffer (2x) zupipettiert um die Reaktion abubrechen. Die anderen Ansätze wurden für drei, sechs, und neun Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, und die Reaktion nach Ablauf der Zeit mit 10 µl Lämmli-Puffer (2x) gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert.

Die Reaktionsansätze wurden im nächsten Schritt gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.5 (Polyacrylamid-) Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die in der Ubiquitinierungsreaktion entstandenen Proteinkomplexe aufzutrennen wurden acht Ansätze (0, 3, 6 und 9 Minutenansatz der Null-Minuten- und der 60-Minuten-Muskelprobe), ein Standard mit 100 ng Ub₆ für die spätere Quantifizierung der Reaktion, ein Farbmarker (5 µl SeeBlue Plus 2), sowie ein Molekulargewichtsmarker (1 µl Biotinylated Protein Ladder) auf ein 4-12 %iges Bis-Tris-Gradientengel aufgetragen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Ansätze und der Standard für zwei Minuten bei 100 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in MES-SDS-Laufpuffer über 1 h 45 min bei 120 V, 70 mA und 10 W. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran geblottet.

2.3.6 Western-Blot

Für den Nassblot wurde die PVDF-Membran zur Vorbereitung kurz in Methanol geschwenkt und dann im Transferpuffer gelagert. Das Gel wurde auf der PVDF-Membran liegend zwischen je zwei Filter-Papieren und zwei Schwämmen in die Kassette luftblasenfrei eingespannt und in die Blottapparatur eingesetzt. Das Gel wurde für eine Dauer von 2,5 Stunden bei 107 V bzw. 1300 mA und in auf 8 °C gekühltem Transferpuffer geblottet. Die auf die Membran geblotteten Proteine konnten nun mit einem Antikörper detektiert werden.

2.3.6.1 Antikörper-Markierung

Nach Entnahme der PVDF-Membran aus der Blottapparatur wurde diese dreimal für je fünf Minuten in PBS/T gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation in Blockpuffer blockiert. Anschließend wurde die Membran 60 min in einer 1: 5000 in Blockpuffer verdünnten HRP-konjugierten „*Anti-Biotin*“-Antikörperlösung inkubiert. Es folgte ein Abwaschen von überschüssigem Antikörper in PBS/T für dreimal 5 min um dann die Detektion durchzuführen.

2.3.6.2 Detektion

Die Detektion des Anti-Biotin-Konjugates wurde durch Messung der Chemilumineszenzreaktion durchgeführt. Hierfür wurden 1 ml des Detektionsreagenz (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate) auf die PVDF-Membran gegeben und für 5 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde überschüssiges Reagenz mithilfe eines Filterpapiers von der Membran entfernt. Die Membran wurde für die Detektion des Chemilumineszenzsignals luftblasenfrei zwischen zwei Folien gebettet.

2.3.7 Dokumentation und Auswertung

Das Detektionsergebniss wurde mit dem *Chemi-Smart* und der zugehörigen Software *Chemi-Capt* unter folgenden Parametern: Blende 0.95, Belichtungszeit 2 min dokumentiert.

Die erstellte Bilddatei (TIF-Format, 1280 x 1024 Pixel, 16-Bit) wurde mit dem Programm *TotalLab* quantitativ ausgewertet. Die Massen (in ng) der einzelnen Banden wurden unter Abgleich des aufgetragenen 100 ng Ub_b Standards errechnet. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden in fmol umgerechnet, und durch die eingesetzte Menge an Gesamtprotein (30 µg) dividiert. Zur Reduzierung der unspezifischen Signale, die in allen Banden gleich vorkamen, wurde jeweils der Null-Minuten-Wert subtrahiert. Mit den 3, 6 und 9 min Werten wurde mittels eines Steigungsdreiecks die Steigung berechnet. Diese wurde auf den Substratumsatz in fmol/s umgerechnet. Der Substratumsatz von 1 fmol Ub_b pro s wurde dann als Gesamtubiquitinierungsrate in fkatal pro µg Gesamtprotein angegeben. Der Messbereich umfasste Proteine mit einem Molekulargewicht > 15 kDa.

Unter Verwendung des Statistikprogramms *GraphPad Prism* wurden die einzelnen Enzymaktivitäten anhand einer Regressionsgeraden statistisch ausgewertet.

2.3.8 Western-Blot Kontrolle - Anfärbung des Gels

Um die im Gel verbliebene Menge an Protein und somit die Qualität des Western Blot zu kontrollieren wurde das Gel 5 min mit Coomassie-Blue angefärbt und anschließend über Nacht in Entfärber gelagert, fotografiert und der Dokumentation beigelegt.

2.3.9 Western-Blot Stripping - Entfernung des Antikörpers von der Membran

Um den HRP-konjugierten „*Anti-Biotin*“-Antikörper von der Membran zu entfernen wurde diese 5 min in PBS/T gewaschen. Anschließend wurde die Membran 15 min bei 37 °C in „*Restor™ PLUS Western Blot Stripping Buffer*“-Lösung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran zweimal für 5 min in PBS/T und einmal 5 min in Aqua dest. gewaschen, dann getrocknet und bei 4°C zwischen zwei Filterpapieren gelagert.

2.3.10 Untersuchung des endogenen Ubiquitins

Für die Analyse des endogenen Ubiquitins wurde bei -80 °C gelagertes Muskellysat verwendet. Für jedes Lysat wurde ein Ansatz mit 30 µg Gesamtprotein, das mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt wurde, und 10 µl Lämmli-Puffer (2x) verwendet. Für die Proteinauftrennung wurden die Ansätze (je 20 µl, entsprechend 30 µg Gesamtprotein) auf ein 4-12 %iges Bis-Tris-Gradientengel aufgetragen. Zusätzlich wurden pro Gel 100 ng Ub als Standard, 5 µl des Farbmekers und 1 µl des Molekulargewichtsmekers auf das Gel aufgetragen.

Nach Denaturierung der Proben und Standards für 2 min bei 100 °C wurden die verschiedenen Ansätze und Substanzen auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert und dann durch Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.3.5). Anschließend wurden sie unter Verwendung des Nassblotverfahrens auf eine PVDF-Membran übertragen (s. 2.3.6).

Das Gel wurde zur Kontrolle mit Coomassie angefärbt (s. 2.3.8). Die Membran wurde dreimal für je 5 min in PBS/T Lösung gewaschen, und dann für 1 h in „*StartingBlock*“-Pufferlösung, zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen, geschwenkt.

Nach der Blockierung wurde für den Nachweis von endogenem Ubiquitin die Membran für 1 h in „*StartingBlock*“-Pufferlösung verdünntem „*Anti-Ubiquitin*“-Antikörper (1:500) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran fünfmal für je 5 min in PBS/T Lösung gewaschen. Es folgte die Inkubation in „*StartingBlock*“-Pufferlösung verdünntem „*Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG*“ (1:20.000) für 1 h. Erneut wurde die Membran fünfmal für je 5 min in PBS/T Lösung gewaschen, um dann die Detektion (s. 2.3.6.2) durchzuführen. Danach wurden die Antikörper von der Membran mit „*Stripping Buffer*“-Lösung entfernt (s. 2.3.9).

Zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmengen wurde eine Ladekontrolle durchgeführt. Dafür wurde die Membran für 2 h in „*StartingBlock*“-Pufferlösung verdünntem „*Anti p44/42 Map Kinase*“-Antikörper (1:2.000) inkubiert und danach fünfmal für je 5 min in PBS/T Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h in „*StartingBlock*“-Pufferlösung verdünntem „*Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG*“ (1:10.000) inkubiert. Die Membran wurde erneut fünfmal für je 5 min in PBS/T Lösung gewaschen, um dann die Detektion (s. 2.3.6.2) durchzuführen.

Anschließend wurde die Membran für 5 min in „*Ponceau S*“-Lösung geschwenkt und anschließend so lange in H₂O gewaschen, bis die Proteinbanden klar erkennbar wurden. Von den Proteinbanden wurde mit dem *Chemi-Smart* und der zugehörigen Software *Chemi-Capt* eine Aufnahme angefertigt und dann quantitativ ausgewertet (s. 2.3.7). Die Membran wurde mit H₂O wieder komplett entfärbt, dann getrocknet und bei 4 °C gelagert.

2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der experimentellen Ergebnisse wurden die Programme G*Power, GraphPad Prism, JMP und Microsoft Excel verwendet. Die Ergebnisse wurden jeweils als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurde nach Überprüfung der Normalverteilung der Ergebnisse mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und dem Newman-Keuls Multiple Comparison Test als Post-Test errechnet. Die Korrelation zwischen freiem und konjugiertem Ub wurde mittels linearer Regressionsanalyse bestimmt.

P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. Die Power-Analyse (post hoc) ergab eine Effektgröße von 0,4.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klinische Daten der Studienpatienten

Die klinischen Daten der Patienten aus Studienarm A und B sind in *Tabelle 3.1* aufgeführt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studienarmen bezüglich der klinischen Daten.

Tabelle 3.1: Klinische Daten der Patienten aus Studienarm A und B
(MW \pm SD bzw. n)

	Patienten	
	Studienarm A	Studienarm B
Anzahl der Patienten	15	15
Blutsperre	Ja	Nein
Geschlecht (weiblich/männlich)	8 / 7	8 / 7
Alter (Jahre)	70,6 \pm 7,5	70,0 \pm 6,1
Größe (cm)	165,2 \pm 10,2	165,4 \pm 9,8
Gewicht (kg)	88,0 \pm 20,8	92,3 \pm 15,1
BMI	32,0 \pm 5,0	33,8 \pm 5,2
OP Seite (links / rechts)	9 / 6	5 / 10
Zeit zwischen 1. und 2. Probenentnahme (min)	59 \pm 2	59 \pm 4
Operationsdauer (min)	79 \pm 19	87 \pm 19
Anästhesieform (Vollnarkose / Spinalanästhesie)	4 / 11	5 / 10
Entnommener Muskel	M. vastus medialis	M. vastus medialis

3.2 Studienarm A mit Blutsperre

3.2.1 Ubiquitinierungsaktivität

Abbildung 3.1 zeigt das Ergebnis der Ubiquitinierungsaktivitätsmessung eines Patienten aus dem Studienarm A. Diese Abbildung steht exemplarisch für alle Studienpatienten dieses Studienarms. Ein Anstieg der Ub_b-Proteinkonjugate war im Verlauf von null bis neun Minuten klar erkennbar. Besonders stark war der kontinuierliche Anstieg im hochmolekularen Bereich oberhalb von 60 kDa. Unterhalb von 20 kDa zeigten sich zwei signalstarke Banden bei denen es sich aufgrund der Lage und Signalintensität um freies Ubiquitin bei 8,5 kDa und Ubiquitin-Dimere bei 17 kDa handelt.

Durch quantitative Auswertung der Ubiquitinierungsaktivitäten des Immunoblots konnte die in *Abbildung 3.2* exemplarisch für alle Patienten des Studienarms A

dargestellte Reaktionskinetik der Ubiquitinierung ermittelt werden. Sie zeigt einen annähernd linearen Anstieg im Bereich zwischen drei und neun Minuten sowohl für die 0 Minuten als auch die 60 Minuten Proben. Die ermittelten Ergebnisse der Ubiquitinierungskinetik sind in *Tabelle 3.2* aufgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Reaktionskinetik der Ubiquitinierungsreaktion.

Im Zeitraum zwischen null und drei Minuten zeigte sich dagegen eine niedrigere Enzymaktivität und somit auch ein geringerer Anstieg des konjugierten Ub_b.

Abbildung 3.1: Ubiquitinierungsaktivität
Immunoblot Detektionsergebnis eines Studienpatienten des Studienarms A (S=Standard, M=Molekulargewichtsmarker). Der Messbereich entspricht dem gekennzeichneten Bereich der Ub_b-Proteinkonjugate.

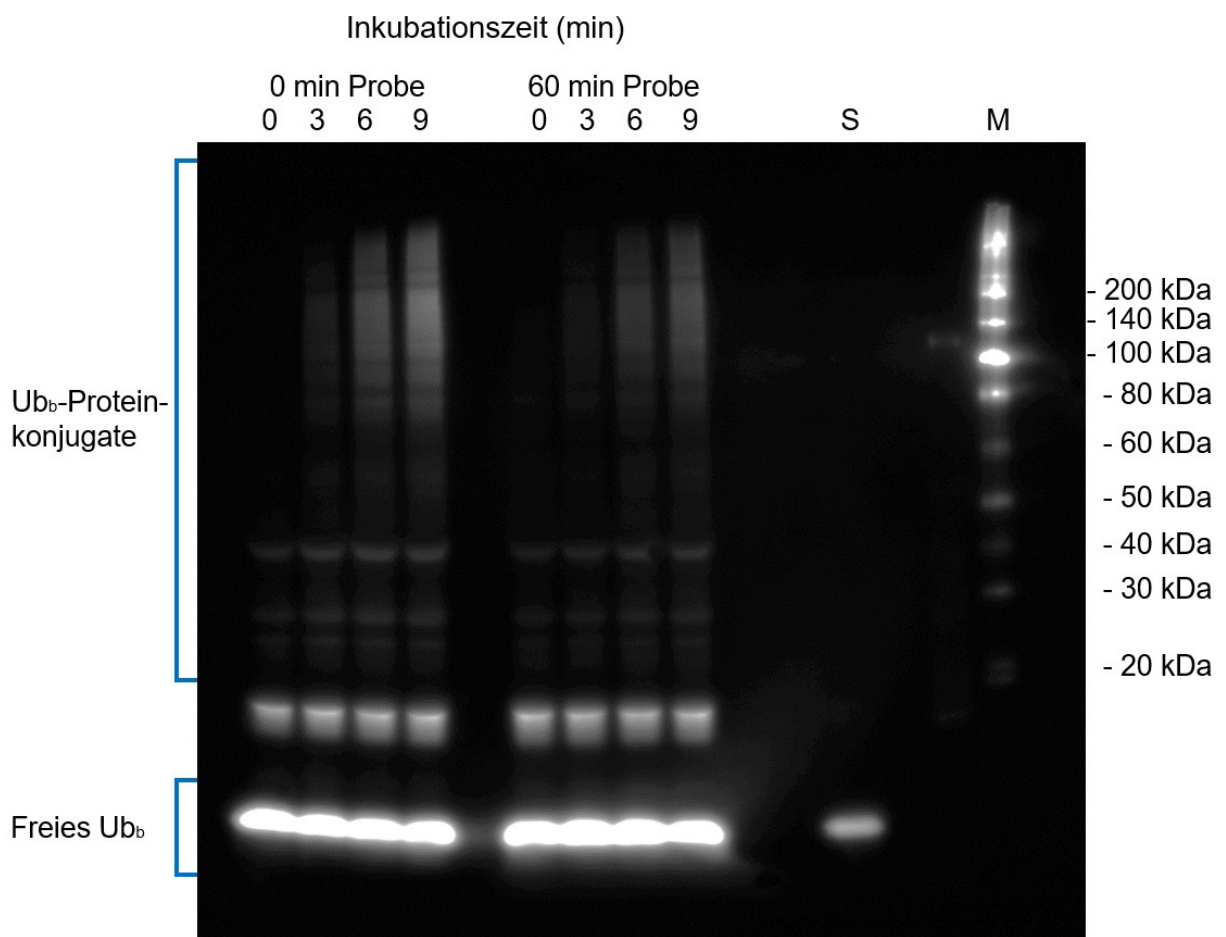


Abbildung 3.2: Reaktionskinetik der Ubiquitinierungsreaktion der humanen Skelettmuskellysate des Studienarms A

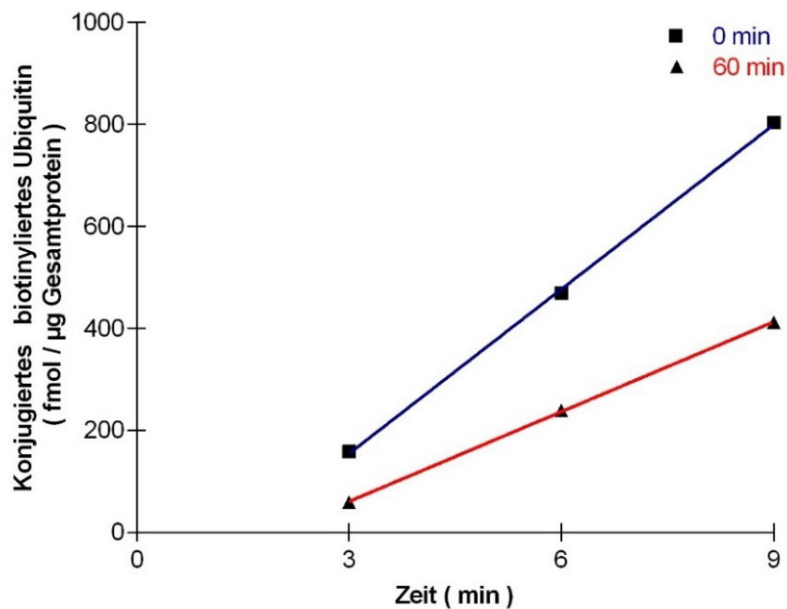


Tabelle 3.2 Ubiquitinierungskinetik über 3, 6 und 9 min der Muskellysate des Studienarms A; MW \pm SD, n=15

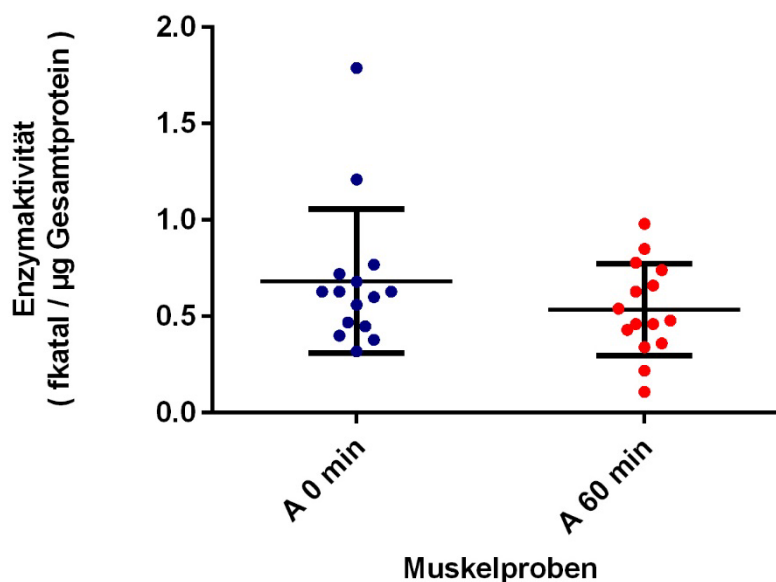
Patient-Nr.	Ubiquitinierungskinetik (fmol / µg Gesamtprotein)					
	A 0 min Probe			A 60 min Probe		
	3 min	6 min	9 min	3 min	6 min	9 min
1	123,27	318,51	560,00	43,69	136,62	271,28
2	58,73	181,82	286,99	82,68	172,98	389,17
3	39,68	142,53	240,06	57,81	149,33	221,91
4	71,62	199,53	329,95	28,41	175,85	293,83
5	50,30	116,38	188,51	35,33	123,84	201,39
6	49,01	102,80	164,88	34,36	58,26	114,98
7	45,83	103,07	189,62	45,86	164,35	91,86
8	51,31	134,16	266,68	19,96	82,83	141,87
9	65,56	185,96	291,82	63,49	145,74	218,40
10	103,19	231,08	363,11	140,08	169,70	312,35
11	62,60	163,41	307,83	35,02	94,68	165,17
12	68,86	140,89	239,05	73,61	260,57	353,23
13	158,67	469,55	803,60	59,59	239,32	411,97
14	58,94	159,27	286,95	71,03	170,72	265,26
15	24,42	100,87	185,49	62,11	100,37	102,07
MW \pm SD	68,80 \pm 33,53	183,32 \pm 94,45	313,64 \pm 160,87	56,87 \pm 28,36	149,68 \pm 52,76	236,98 \pm 99,46

Durch die Quantifizierung der kovalenten Bindungen von Ub_b an Lysatproteine konnte anhand der Reaktionskinetik die Gesamtubiquitinproteinligationsrate ermittelt werden (s. Tabelle 3.3 und Abbildung 3.3).

Tabelle 3.3: Ubiquitinierungsaktivität der Muskellysate des Studienarms A;
MW \pm SD, n=15

Patient-Nr.	Enzymaktivität (fkatal / μ g Gesamtprotein)	
	A 0 min Probe	A 60 min Probe
1	1,21	0,63
2	0,63	0,85
3	0,56	0,46
4	0,77	0,74
5	0,38	0,46
6	0,32	0,22
7	0,40	0,66
8	0,60	0,34
9	0,63	0,43
10	0,72	0,48
11	0,68	0,36
12	0,47	0,78
13	1,79	0,98
14	0,63	0,54
15	0,45	0,11
MW \pm SD	0,68 \pm 0,37	0,54 \pm 0,24

Abbildung 3.3: Ubiquitinierungsaktivität der Muskellysate des Studienarms A; MW \pm SD, n=15



Für den Studienarm A ergab sich bei einer Probenanzahl von n=15 für die 0 Minuten Proben eine mittlere Enzymaktivität von $0,68 \pm 0,37$ fkat/ μ g Gesamtprotein (MW \pm SD), und für die 60 Minuten Proben eine mittlere Enzymaktivität von $0,54 \pm 0,24$ fkat/ μ g

Gesamtprotein (MW \pm SD). Die Unterschiede zwischen der 0 und 60 Minuten Probe waren statistisch nicht signifikant ($p=0,21$).

3.2.2 Proteasomenaktivität

Als zweites sollte nun nach der Analyse der Ubiquitinierungsaktivität die Proteasomenaktivität untersucht werden. Die verschiedenen hydrolytischen (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlichen) Aktivitäten wurde durch Zugabe von drei unterschiedlichen Substraten gemessen. Durch die Verwendung von Inhibitoren konnten Proteasomen-abhängige Peptidaseaktivitäten und Proteasomen-unabhängigen Peptidaseaktivitäten unterschieden werden (s. 2.3.3).

Die Proteasomen-abhängige Peptidaseaktivität ergibt sich durch Abzug der Peptidaseaktivität in Gegenwart von Proteasomeninhibitoren von der Gesamtpeptidaseaktivität. Die durch Fluoreszenzspektroskopie ermittelten Messergebnisse sind in *Tabelle 3.4* und *Abbildung 3.4-3.6* dargestellt.

Abbildung 3.4: Proteasomen-abhängige Caspase-ähnliche Aktivität des Studienarms A; MW \pm SD, $n=15$

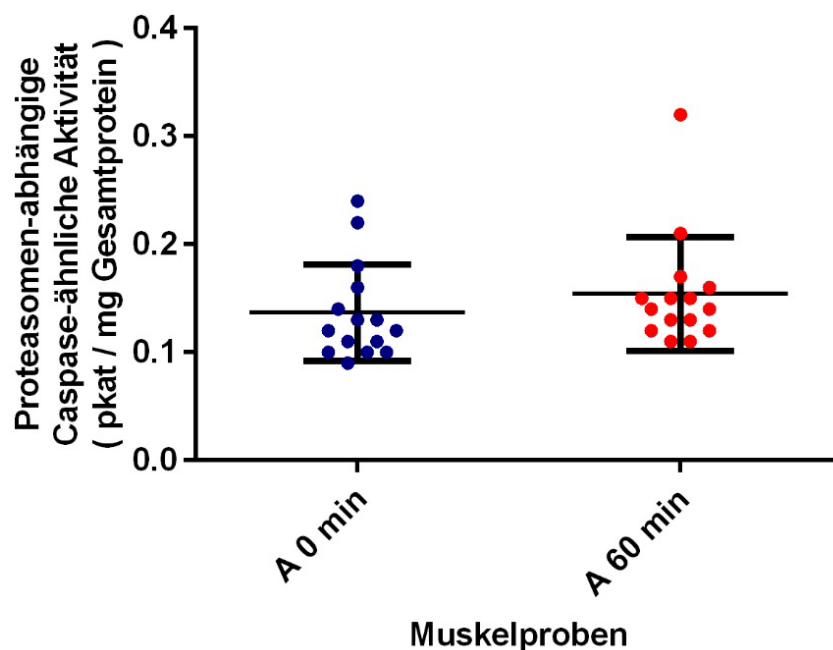


Abbildung 3.5: Proteasomen-abhängige Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Studienarms A; MW \pm SD, n=15

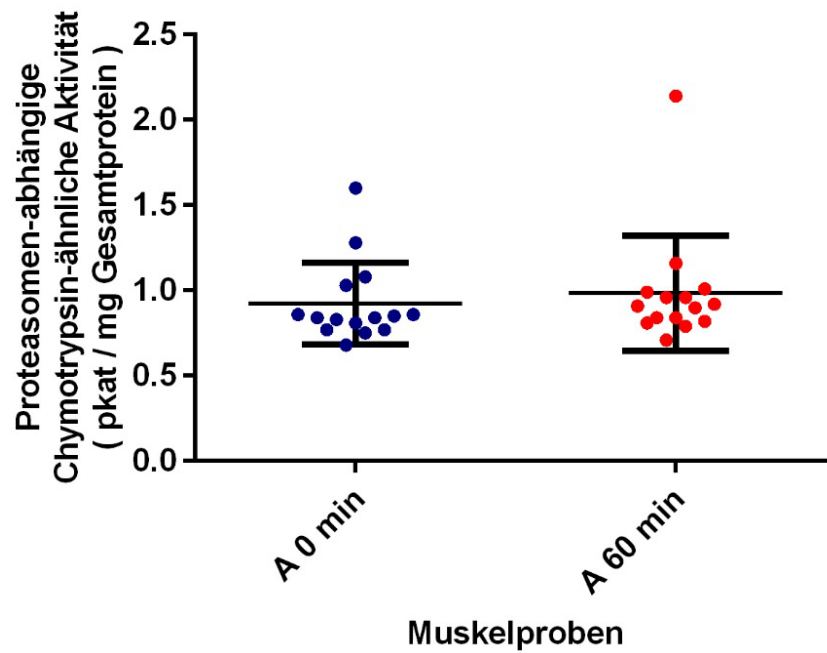


Abbildung 3.6: Proteasomen-abhängige Trypsin-ähnliche Aktivität des Studienarms A; MW \pm SD, n=15

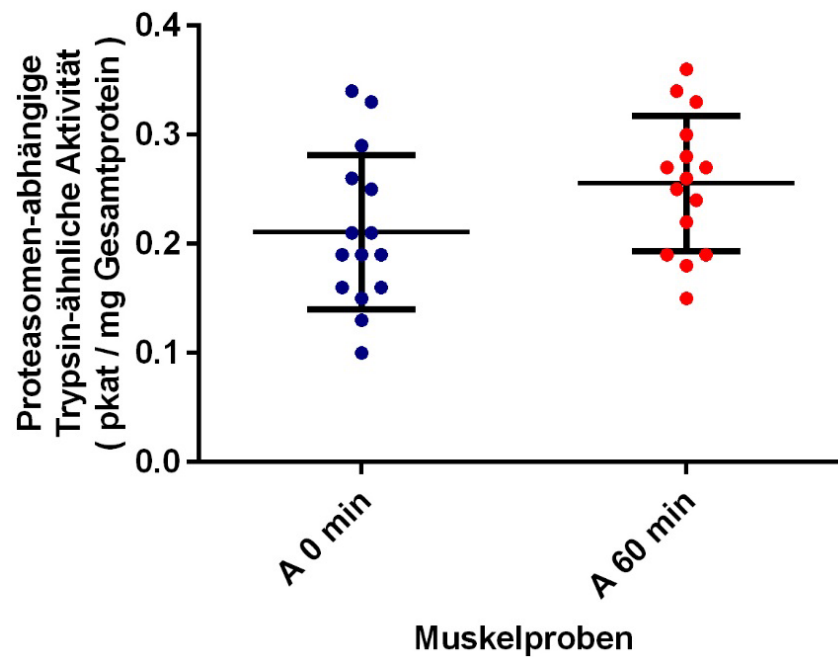


Tabelle 3.4: Proteasomen-abhängige Peptidaseaktivität (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche) der 0 und 60 Minuten Proben aus Studienarm A; MW \pm SD, n=15

Patient -Nr.	Caspase-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Chymotrypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Trypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]	
	A0	A60	A0	A60	A0	A60
1	0,12	0,13	0,84	0,84	0,34	0,36
2	0,09	0,13	0,77	0,82	0,26	0,27
3	0,14	0,17	0,85	0,96	0,19	0,18
4	0,13	0,16	0,84	0,91	0,19	0,26
5	0,10	0,14	0,77	0,96	0,16	0,24
6	0,11	0,15	0,81	0,99	0,15	0,22
7	0,12	0,15	0,86	1,01	0,19	0,25
8	0,10	0,11	0,83	0,81	0,21	0,19
9	0,16	0,12	1,03	0,84	0,29	0,34
10	0,11	0,12	0,75	0,79	0,16	0,15
11	0,24	0,21	1,28	1,16	0,25	0,33
12	0,10	0,15	0,68	0,92	0,21	0,30
13	0,18	0,11	1,08	0,71	0,33	0,28
14	0,13	0,14	0,86	0,90	0,10	0,19
15	0,22	0,32	1,60	2,14	0,13	0,27
MW\pmSD	0,14 \pm 0,04	0,15 \pm 0,05	0,92 \pm 0,24	0,98 \pm 0,34	0,21 \pm 0,07	0,26 \pm 0,06

Im Studienarm A zeigten sich bei einer Probenanzahl von n=15 für die Proteasomen-abhängigen Peptidaseaktivitäten mittlere Werte von 0,14 \pm 0,04 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und 0,15 \pm 0,05 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben für die Caspase-ähnliche Aktivität (p=0,34).

Für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität ergaben sich mittlere Werte von 0,92 \pm 0,24 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und 0,98 \pm 0,34 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben (p=0,58).

Die mittleren Werte für die Trypsin-ähnliche Aktivität lagen bei 0,21 \pm 0,07 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und 0,26 \pm 0,06 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben (p=0,08).

Die Proteasomen-unabhängige Peptidaseaktivität ergibt sich aus der Peptidaseaktivität in Gegenwart von Proteasomeninhibitoren. Die Messergebnisse sind in *Tabelle 3.5* und *Abbildung 3.7 - 3.8* dargestellt.

Abbildung 3.7: Proteasomen-unabhängige Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Studienarms A sowie MW \pm SD, n=15

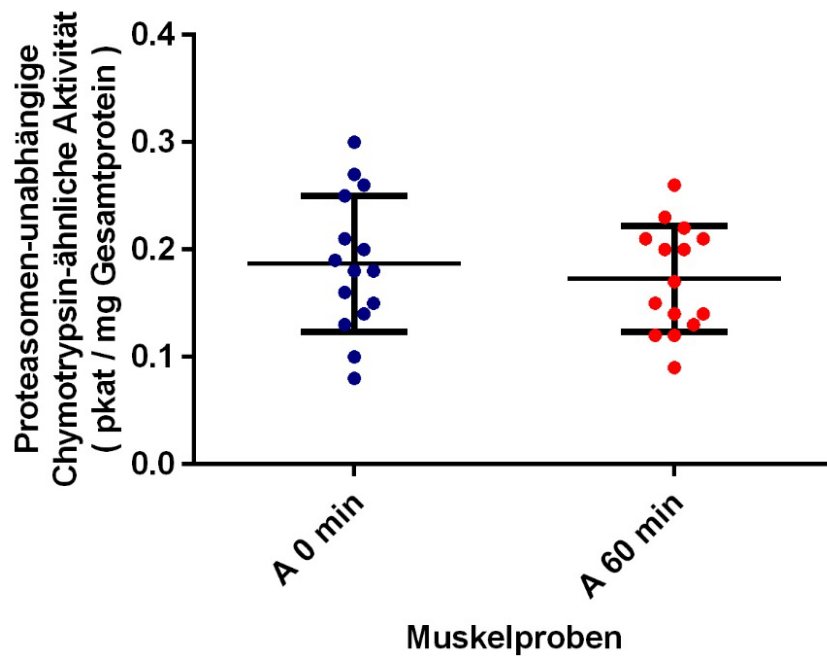


Abbildung 3.8: Proteasomen-unabhängige Trypsin-ähnliche Aktivität des Studienarms A; MW \pm SD, n=15

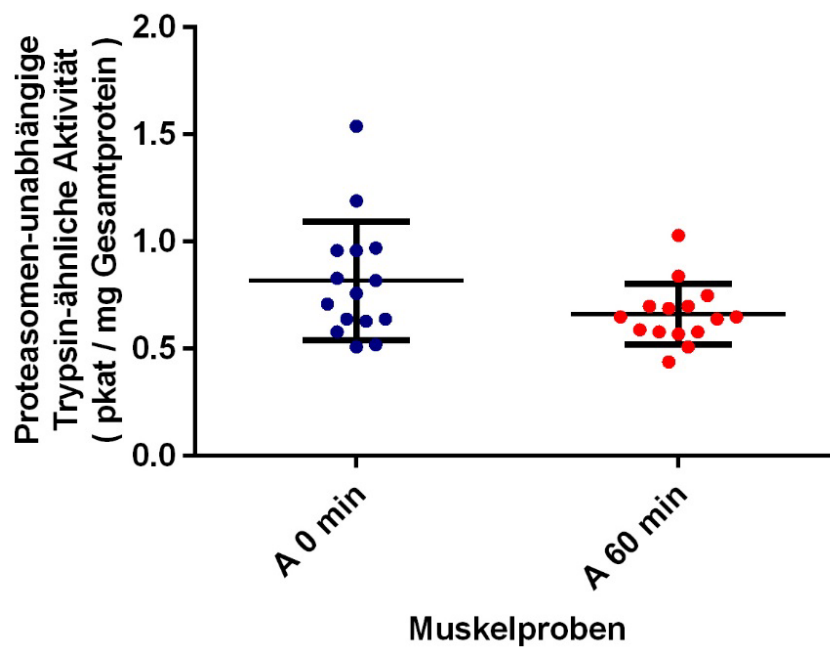


Tabelle 3.5: Proteasomen-unabhängige Peptidaseaktivitäten (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche) der 0 und 60 Minuten Proben aus Studienarm A sowie MW \pm SD, n=15

Patient -Nr.	Caspase-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Chymotrypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Trypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]	
	A0	A60	A0	A60	A0	A60
1	0,0	0,0	0,14	0,12	0,82	0,64
2	0,0	0,0	0,26	0,21	0,64	0,44
3	0,0	0,0	0,25	0,23	0,51	0,57
4	0,0	0,0	0,21	0,22	0,58	0,58
5	0,0	0,0	0,30	0,26	0,97	0,84
6	0,0	0,0	0,13	0,12	1,19	0,75
7	0,0	0,0	0,19	0,21	0,83	0,69
8	0,0	0,0	0,18	0,15	0,52	0,59
9	0,0	0,0	0,18	0,14	0,96	0,65
10	0,0	0,0	0,08	0,09	0,63	0,70
11	0,0	0,0	0,20	0,17	1,54	1,03
12	0,0	0,0	0,15	0,20	0,64	0,65
13	0,0	0,0	0,27	0,20	0,96	0,70
14	0,0	0,0	0,16	0,14	0,76	0,51
15	0,0	0,0	0,10	0,13	0,71	0,58
MW\pmSD	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,19 \pm 0,06	0,17 \pm 0,05	0,82 \pm 0,28	0,66 \pm 0,14

Im Studienarm A zeigten sich bei einer Probenanzahl von n=15 für die Proteasomen-unabhängigen Peptidaseaktivitäten mittlere Werte von 0,0 \pm 0,0 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) sowohl in den 0 Minuten Proben als auch in den 60 Minuten Proben für die Caspase-ähnliche Aktivität (p=0,15).

Für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität ergaben sich mittlere Werte von 0,19 \pm 0,06 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und 0,17 \pm 0,05 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben (p=0,51).

Die mittleren Werte für die Trypsin-ähnliche Aktivität lagen bei 0,82 \pm 0,28 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und 0,66 \pm 0,14 pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben (p=0,06).

3.2.3 Endogenes Ubiquitin

Als drittes wurde nach der Analyse der Ubiquitinierungs- und Proteasomenaktivität das endogene Ubiquitin analysiert. Dazu wurden die 0 und 60 Minuten Proben auf freies Ub und Ub-Proteinkonjugate untersucht.

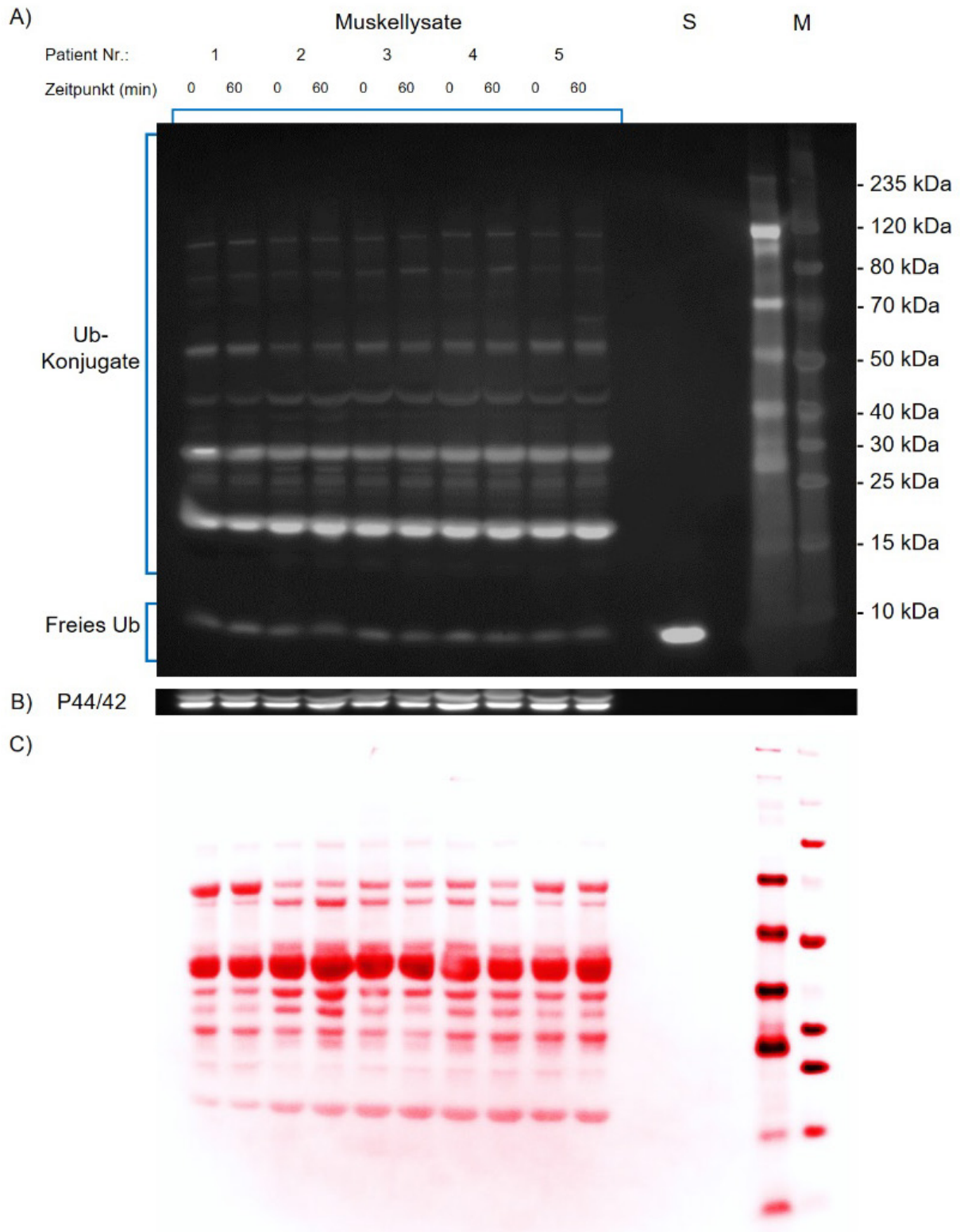
In *Abbildung 3.9* ist ein Immunoblot des Studienarms A, der nach der beschriebenen Methodik (s. 2.3.12) erstellt wurde, dargestellt. Diese Abbildung steht exemplarisch für alle Studienpatienten des Studienarms A. Zur Kontrolle des aufgetragenen Gesamtproteins wurde die Membran zum einen mit einem Antikörper gegen die p44/42 MAP-Kinase (Erk1/2) inkubiert, und zum anderen mit „*Ponceau S*“ gefärbt.

Die *Tabelle 3.6* und die *Abbildung 3.10-3.11* zeigen die durch densitometrische Auswertung der Proteinbanden erhaltenen Werte für das endogene Ubiquitin der 0 und 60 Minuten Proben der Studienpatienten aus dem Studienarm A, unter quantitativer Berücksichtigung der p44/p42-Ladekontrollen.

Tabelle 3.6: Ub-Proteinkonjugate und freies Ub in den Muskellysaten des Studienarms A (mit Blutsperre) sowie MW \pm SD, n=15

Patient-Nr.	Ub-Proteinkonjugate (ng/ μ g Gesamtprotein)		Freies Ub (ng/ μ g Gesamtprotein)	
	A 0 min	A 60min	A 0 min	A 60 min
1	27,36	28,11	1,71	1,87
2	28,74	29,30	1,77	1,81
3	29,26	30,10	1,84	2,02
4	30,34	30,02	2,08	1,94
5	29,03	28,27	1,85	1,91
6	12,39	12,67	1,73	1,81
7	13,42	14,24	1,97	2,00
8	14,57	14,95	1,89	2,16
9	16,02	16,36	2,11	1,91
10	15,90	15,61	1,73	1,63
11	12,39	12,67	0,84	0,99
12	13,42	14,24	0,93	0,89
13	14,57	14,95	0,93	0,89
14	16,02	16,36	0,94	0,90
15	15,90	15,61	0,92	0,93
MW \pm SD	19,29 \pm 7,19	19,56 \pm 7,12	1,55 \pm 0,48	1,58 \pm 0,50

Abbildung 3.9: Endogenes Ubiquitin



- A) Immunoblot Detektionsergebnis der 0 und 60 Minuten Proben von fünf Patienten, 100 ng Ub-Standard (S), Molekulargewichtsmarker (M), Messbereich: Ub-Konjugate bzw. freies Ub;
- B) Ladekontrolle mit p44/42 MAP Kinase-Antikörpern (Erk1/2);
- C) „Ponceau S“-Färbung der Membran zur Darstellung der Gesamtproteinmenge der einzelnen Banden;

Abbildung 3.10: Ubiquitin-Proteinkonjugate der Muskellysate des Studienarms A (mit Blutsperre); MW \pm SD, n=15

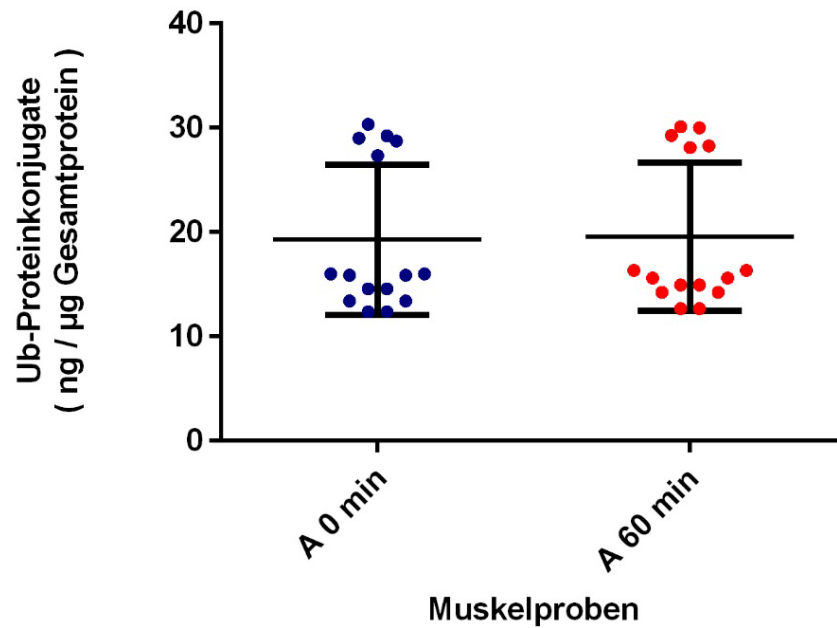
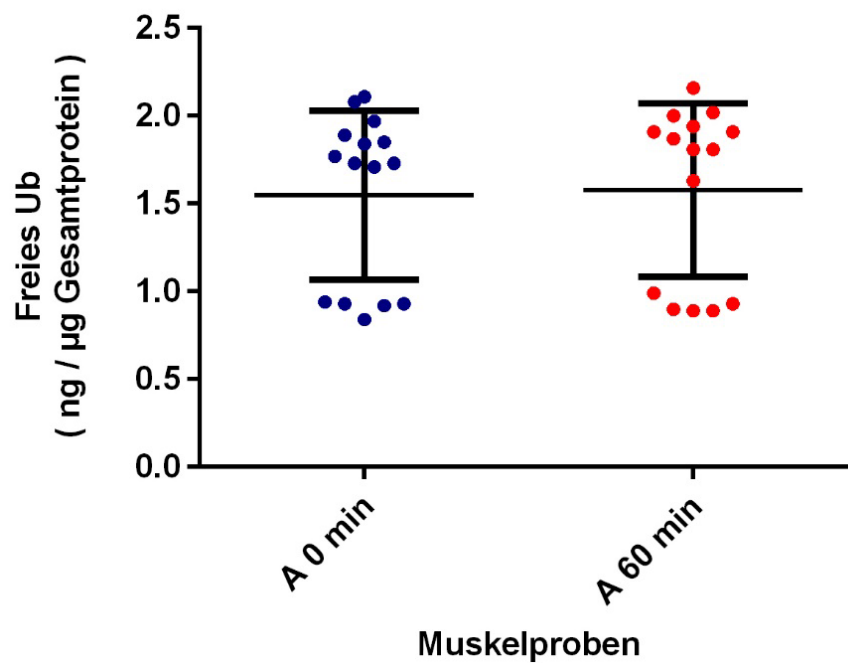


Abbildung 3.11: Freies Ubiquitin der Muskellysate des Studienarms A (mit Blutsperre); MW \pm SD, n=15



Im Studienarm A zeigten sich für die Ub-Proteinkonjugate in den Muskellysaten Mittelwerte von $19,29 \pm 7,19$ ng/µg Gesamtprotein (MW \pm SD) für die 0 Minuten Proben und $19,56 \pm 7,12$ ng/µg Gesamtprotein (MW \pm SD) für die 60 Minuten Proben bei einer

Probenanzahl von jeweils $n=15$. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der 0 und 60 Minuten Probe ($p=0,92$).

Für das freie Ubiquitin in den Muskellysaten ergaben sich Mittelwerte von $1,55 \pm 0,48$ ng/ μ g Gesamtprotein (MW \pm SD) für die 0 Minuten Proben und $1,58 \pm 0,50$ ng/ μ g Gesamtprotein (MW \pm SD) für die 60 Minuten Proben bei einer Probenanzahl von je $n=15$. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der 0 und 60 Minuten Probe ($p=0,88$).

3.3 Studienarm B ohne Blutsperre

3.3.1 Ubiquitinierungsaktivität

In *Abbildung 3.12* ist exemplarisch für den Studienarm B das Ergebnis der Ubiquitinierungsaktivitätsmessung eines Patienten aus dieser Kohorte dargestellt.

Ein Anstieg der Ub_b-Proteinkonjugate war auch hier im Verlauf von null bis neun Minuten klar erkennbar. Besonders stark ist der kontinuierliche Anstieg im hochmolekularen Bereich oberhalb von 60 kDa. Unterhalb von 20 kDa zeigen sich zwei signalstarke Banden bei denen es sich aufgrund der Lage und Signalintensität um freies Ubiquitin bei 8,5 kDa und Ubiquitin-Dimere bei 17 kDa handelt.

Die Reaktionskinetik zeigte im Bereich zwischen drei und neun Minuten einen annähernd linearen Anstieg, welcher anhand eines Patienten aus Studienarm B in *Abbildung 3.13* exemplarisch für den ganzen Studienarm dargestellt ist. Die ermittelten Ergebnisse der Ubiquitinierungskinetik sind in *Tabelle 3.7* aufgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Reaktionskinetik der Ubiquitinierungsreaktion.

Im Zeitraum zwischen null und drei Minuten zeigte sich dagegen eine niedrigere Enzymaktivität und somit auch ein geringerer Anstieg des konjugierten Ub_b.

Abbildung 3.12: Ubiquitinierungsaktivität:
Immunoblot Detektionsergebnis eines Studienpatienten des Studienarms B (S=Standard, M=Molekulargewichtsmarker). Der Messbereich entspricht dem gekennzeichneten Bereich der Ub_b-Proteinkonjugate.

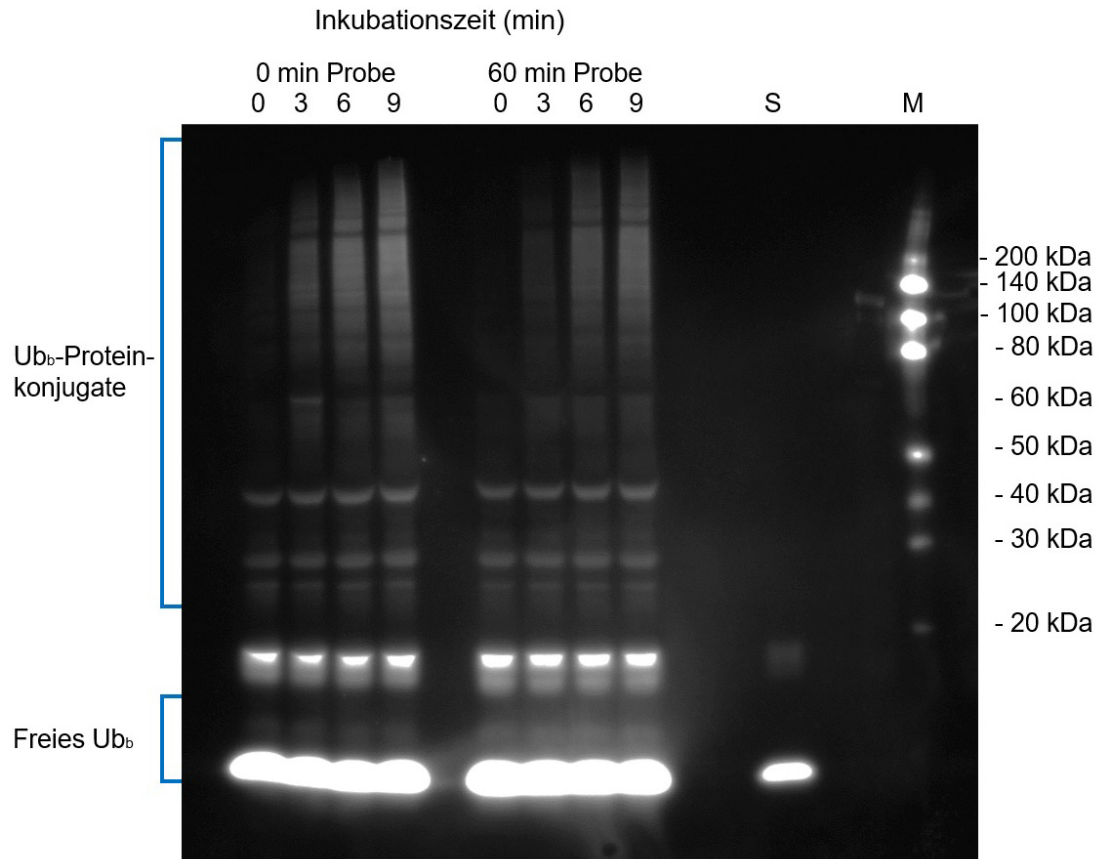


Abbildung 3.13: Reaktionskinetik der Ubiquitinierungsreaktion der humanen Skelettmuskellysate des Studienarms B

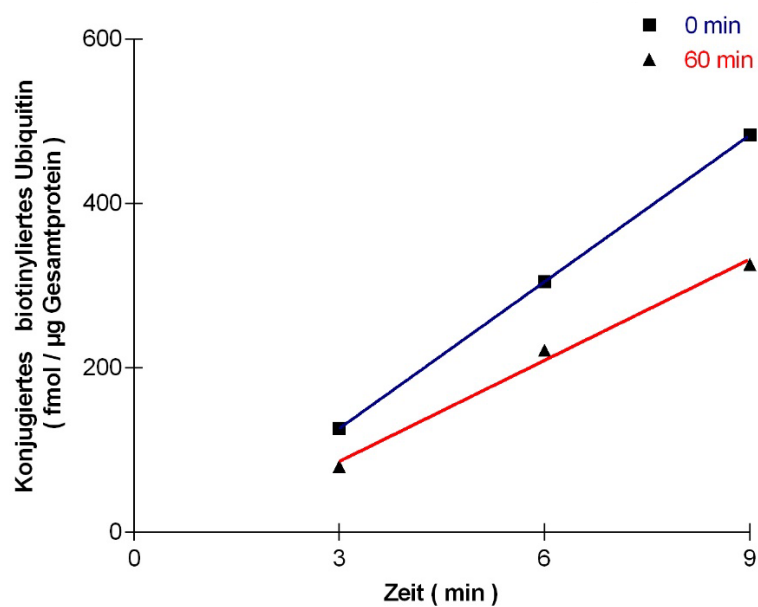


Tabelle 3.7 Ubiquitinierungskinetik über 3, 6 und 9 min der Muskellysate des Studienarms B; MW \pm SD, n=15

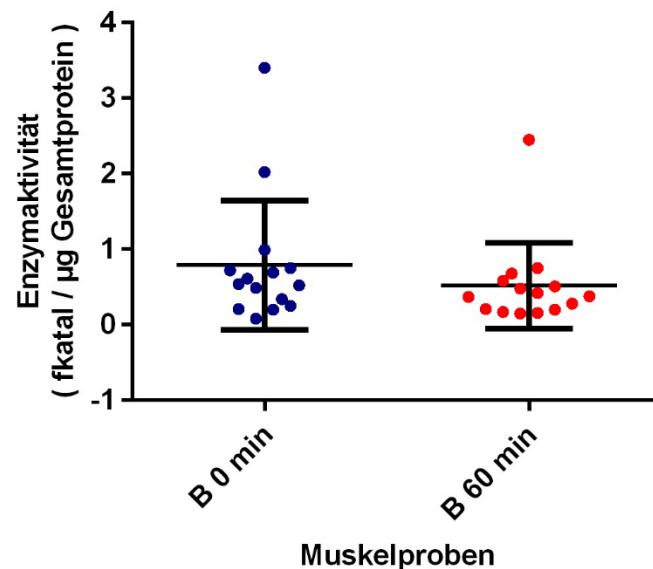
Patient-Nr.	Ubiquitinierungskinetik (fmol / μ g Gesamtprotein)					
	B 0 min Probe			B 60 min Probe		
	3 min	6 min	9 min	3 min	6 min	9 min
1	208,87	530,94	934,92	42,86	208,40	250,94
2	28,78	79,69	205,66	41,43	82,86	98,54
3	58,69	127,10	182,84	53,77	124,79	190,61
4	49,47	74,77	124,66	-0,94	70,13	181,69
5	8,31	14,07	37,96	-5,09	17,74	70,58
6	74,11	177,27	269,05	51,07	116,42	150,16
7	71,25	190,10	318,68	46,52	121,58	196,26
8	72,35	174,08	291,12	22,97	67,70	155,17
9	379,98	1127,41	1602,78	286,76	782,40	1169,01
10	30,26	73,08	101,93	57,24	95,46	111,23
11	38,26	88,20	129,55	32,31	63,56	93,62
12	95,32	230,66	365,65	67,17	178,94	239,41
13	126,41	304,55	483,33	80,04	221,34	325,96
14	68,70	165,47	328,83	36,32	87,74	107,99
15	60,79	137,94	247,15	33,08	175,96	303,10
MW \pm SD	91,44 \pm 89,83	233,02 \pm 267,10	374,94 \pm 387,24	56,37 \pm 65,32	161,00 \pm 175,15	242,95 \pm 258,40

Die Messergebnisse der Ubiquitinierungsaktivität sind in *Tabelle 3.8* und der *Abbildung 3.14* dargestellt.

Tabelle 3.8: Ubiquitinierungsaktivität der Muskellysate des Studienarms B; MW \pm SD, n=15

Patient-Nr.	Enzymaktivität (fkatal / μ g Gesamtprotein)	
	B 0 min Probe	B 60 min Probe
1	2,02	0,58
2	0,49	0,16
3	0,34	0,38
4	0,21	0,51
5	0,08	0,21
6	0,54	0,28
7	0,69	0,42
8	0,61	0,37
9	3,40	2,45
10	0,20	0,15
11	0,25	0,17
12	0,75	0,48
13	0,99	0,68
14	0,72	0,20
15	0,52	0,75
MW \pm SD	0,79 \pm 0,86	0,52 \pm 0,57

Abbildung 3.14: Ubiquitinierungsaktivität der Muskellysate des Studienarms B; MW \pm SD, n=15



Für den Studienarm B ergab sich bei einer Probenanzahl von n=15 für die 0 Minuten Proben eine mittlere Enzymaktivität von $0,79 \pm 0,86$ fkat/ μ g Gesamtprotein (MW \pm SD), und für die 60 Minuten Proben eine mittlere Enzymaktivität von $0,52 \pm 0,57$ fkat/ μ g Gesamtprotein (MW \pm SD). Die Unterschiede zwischen der 0 und 60 Minuten Probe waren statistisch nicht signifikant ($p=0,32$).

3.3.2 Proteasomenaktivität

Wie auch im Studienarm A wurde als zweites die Proteasomenaktivität bestimmt um zu sehen wie diese bei Operationen ohne Blutsperre reagiert. Die verschiedenen hydrolytischen (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlichen) Aktivitäten wurde durch Zugabe von drei unterschiedlichen Substraten gemessen. Durch die Verwendung von Inhibitoren konnten Proteasomen-abhängige Peptidaseaktivitäten von Proteasomen-unabhängigen Peptidaseaktivitäten ermittelt werden (s. 2.3.3).

Die Messergebnisse der Proteasomen-abhängigen Peptidaseaktivitäten sind in *Tabelle 3.9* und den *Abbildungen 3.15 - 3.17* dargestellt, die der Proteasomen-unabhängigen Peptidaseaktivitäten in *Tabelle 3.10* und den *Abbildungen 3.18 -3.19*.

Tabelle 3.9: Proteasomen-abhängige Peptidaseaktivität (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche) der 0 und 60 Minuten Proben aus Studienarm B; MW \pm SD, n=15

Patient -Nr.	Caspase-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Chymotrypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Trypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]	
	B0	B60	B0	B60	B0	B60
1	0,19	0,09	1,06	0,57	0,15	0,20
2	0,07	0,05	0,50	0,31	0,56	0,08
3	0,05	0,08	0,46	0,53	0,06	0,16
4	0,06	0,11	0,44	0,70	0,09	0,18
5	0,01	0,03	0,12	0,20	0,16	0,11
6	0,07	0,06	0,49	0,40	0,11	0,15
7	0,13	0,11	0,93	0,69	0,16	0,14
8	0,24	0,15	1,34	0,88	0,15	0,19
9	0,16	0,15	0,96	0,92	0,19	0,20
10	0,10	0,12	0,76	0,88	0,07	0,18
11	0,10	0,07	0,73	0,57	0,13	0,13
12	0,12	0,07	0,78	0,59	0,19	0,19
13	0,12	0,10	0,80	0,67	0,18	0,14
14	0,11	0,08	0,77	0,50	0,19	0,15
15	0,10	0,10	0,73	0,73	0,09	0,18
MW\pmSD	0,11 \pm 0,06	0,09 \pm 0,03	0,72 \pm 0,30	0,61 \pm 0,21	0,17 \pm 0,12	0,16 \pm 0,03

Abbildung 3.15: Proteasomen-abhängige Caspase-ähnliche Aktivität des Studienarms B; MW \pm SD, n=15

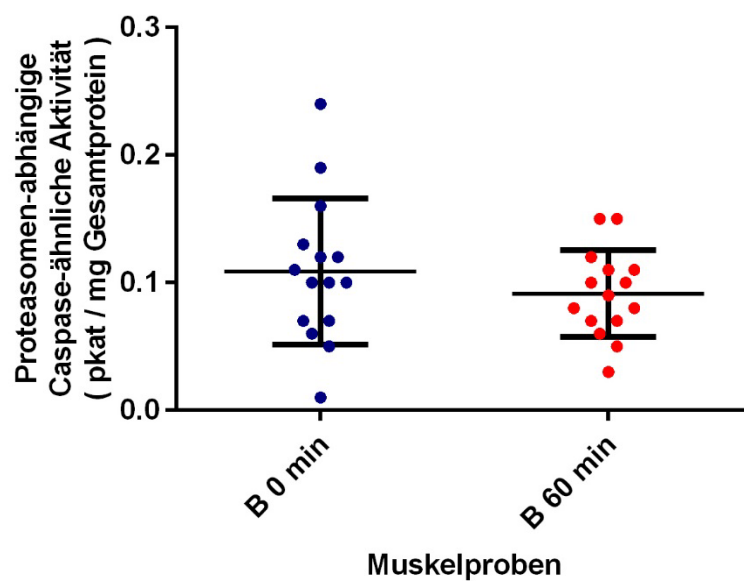


Abbildung 3.16: Proteasomen-abhängige Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Studienarms B; MW \pm SD, n=15

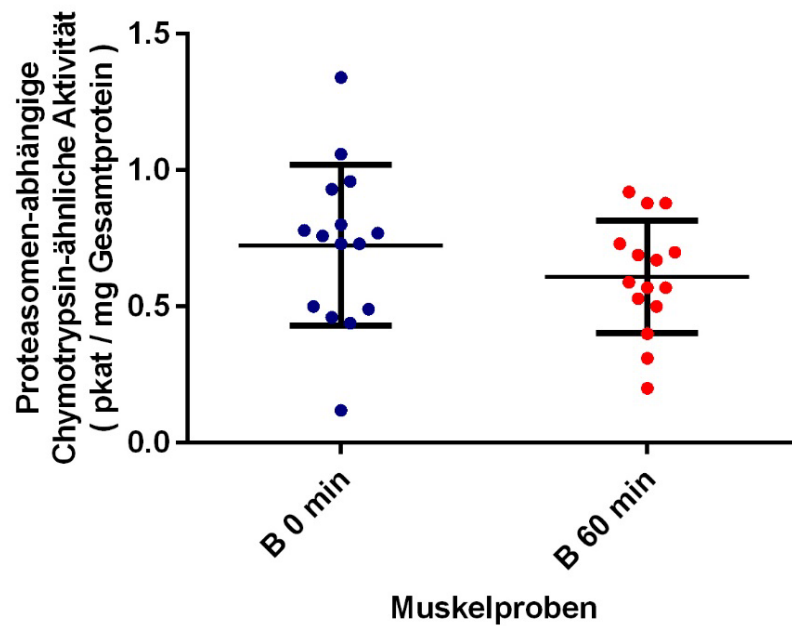


Abbildung 3.17: Proteasomen-abhängige Trypsin-ähnliche Aktivität des Studienarms B; MW \pm SD, n=15

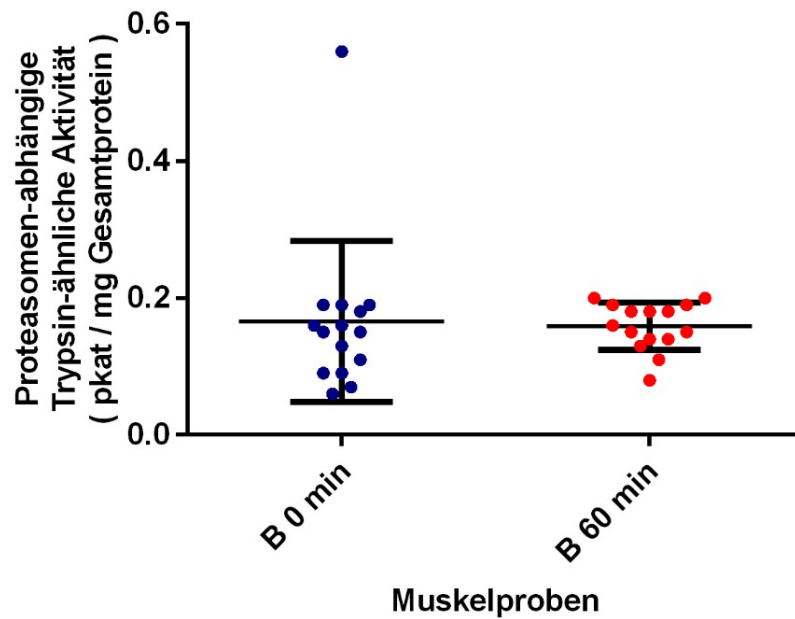


Tabelle 3.10: Proteasomen-unabhängige Peptidaseaktivitäten (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche) der 0 und 60 Minuten Proben aus Studienarm B; MW \pm SD, n=15

Patient-Nr.	Caspase-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Chymotrypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Trypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]	
	B0	B60	B0	B60	B0	B60
1	0,0	0,0	0,21	0,10	0,84	0,44
2	0,0	0,0	0,05	0,02	0,27	0,16
3	0,0	0,0	0,07	0,10	0,83	0,64
4	0,0	0,0	0,05	0,10	0,31	0,43
5	0,0	0,0	0,01	0,02	0,28	0,16
6	0,0	0,0	0,06	0,05	0,59	0,47
7	0,0	0,0	0,14	0,07	0,51	0,31
8	0,0	0,0	0,17	0,09	1,56	0,71
9	0,0	0,0	0,14	0,10	0,58	0,40
10	0,0	0,0	0,18	0,17	0,84	0,77
11	0,0	0,0	0,18	0,10	0,58	0,36
12	0,0	0,0	0,18	0,15	0,79	0,66
13	0,0	0,0	0,21	0,15	0,90	0,77
14	0,0	0,0	0,17	0,08	0,25	0,15
15	0,0	0,0	0,11	0,10	0,97	0,63
MW\pmSD	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,13 \pm 0,07	0,09 \pm 0,04	0,67 \pm 0,35	0,47 \pm 0,22

Abbildung 3.18: Proteasomen-unabhängige Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Studienarms B; MW \pm SD, n=15

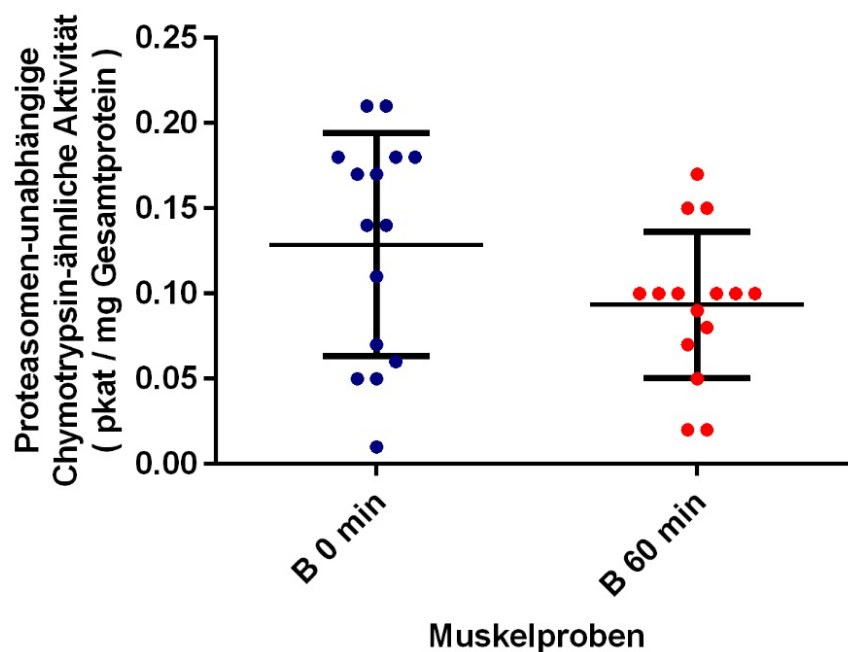
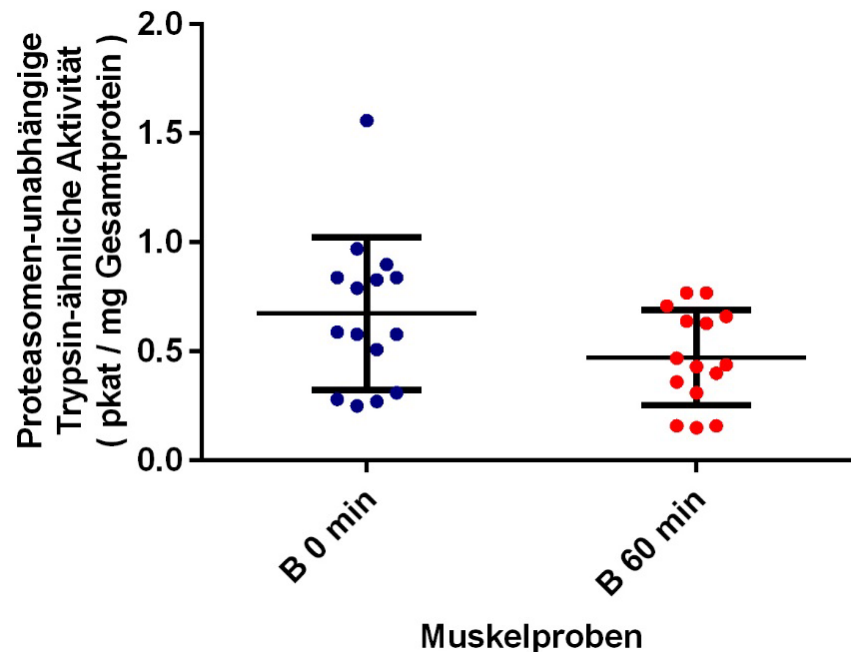


Abbildung 3.19: Proteasomen-unabhängige Trypsin-ähnliche Aktivität des Studienarms B; MW \pm SD, n=15



Im Studienarm B zeigten sich bei einer Probenanzahl von n=15 für die Proteasomen-abhängigen Peptidaseaktivitäten mittlere Werte von $0,11 \pm 0,06$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und $0,09 \pm 0,03$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben für die Caspase-ähnliche Aktivität ($p=0,32$).

Für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität ergaben sich mittlere Werte von $0,72 \pm 0,30$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und $0,61 \pm 0,21$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben ($p=0,23$).

Die mittleren Werte für die Trypsin-ähnliche Aktivität lagen bei $0,17 \pm 0,12$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und $0,16 \pm 0,03$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben ($p=0,84$).

Für die Proteasomen-unabhängigen Peptidaseaktivitäten zeigten sich im Studienarm B bei einer Probenanzahl von n=15 für die Caspase-ähnliche Aktivität mittlere Werte von $0,0 \pm 0,0$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) sowohl in den 0 Minuten als auch in den 60 Minuten Proben ($p=0,07$).

Für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität ergaben sich mittlere Werte von $0,13 \pm 0,07$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und $0,09 \pm 0,04$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben ($p=0,09$).

Die mittleren Werte für die Trypsin-ähnliche Aktivität lagen bei $0,67 \pm 0,35$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 0 Minuten Proben und $0,47 \pm 0,22$ pkat/mg Gesamtprotein (MW \pm SD) in den 60 Minuten Proben ($p=0,07$).

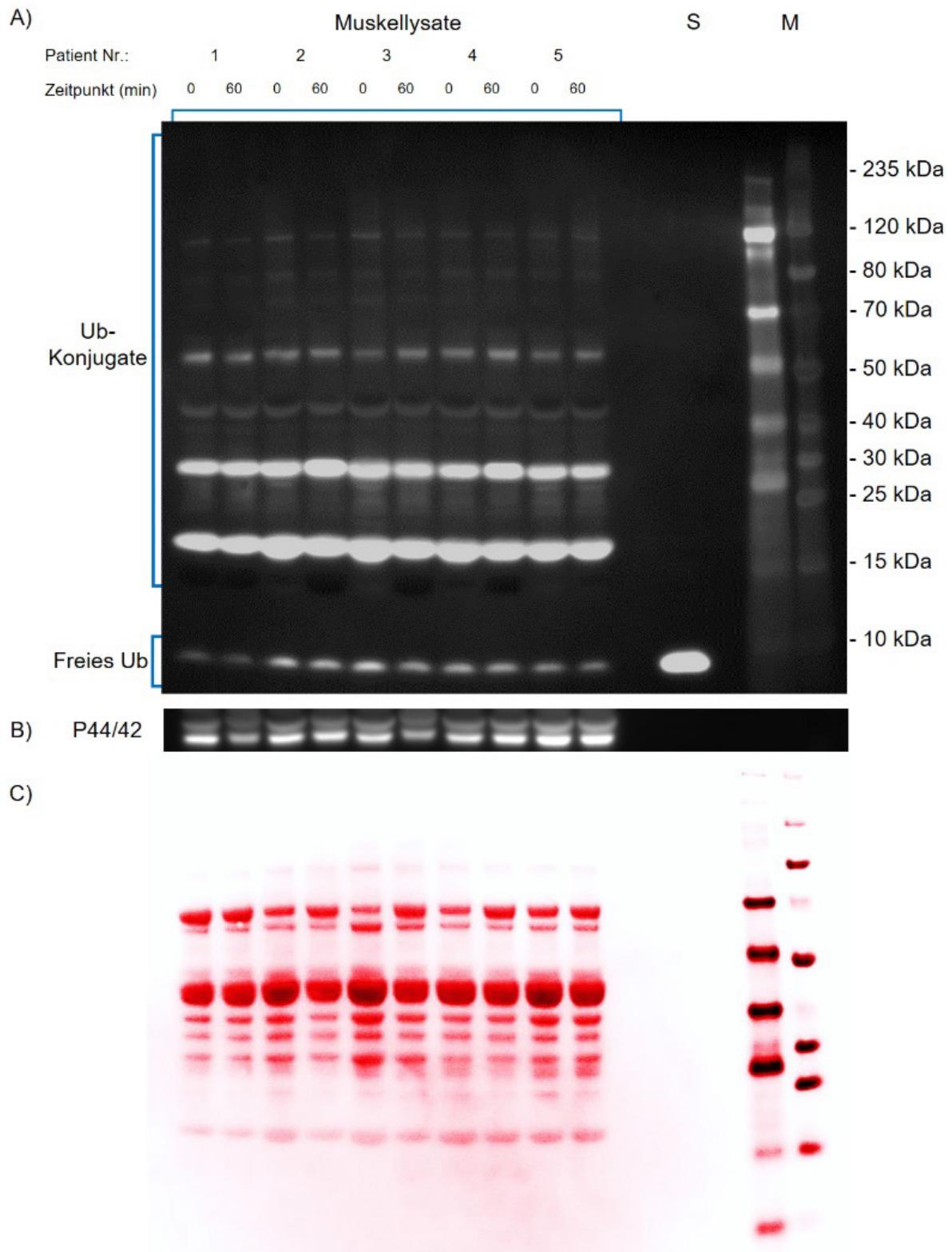
3.3.3 Endogenes Ubiquitin

Abbildung 3.20 zeigt einen Immunoblot des Studienarms B der nach der beschriebenen Methodik (s. 2.3.12) erstellt wurde und steht exemplarisch für alle Studienpatienten dieser Kohorte. Zur Kontrolle des aufgetragenen Gesamtproteins wurde die Membran zum einen mit einem Antikörper gegen die p44/42 MAP-Kinase (Erk1/2) inkubiert, und zum anderen mit „Ponceau S“ gefärbt. Die Messergebnisse des endogenen Ubiquitins der Patienten des Studienarms B sind in *Tabelle 3.11* und den *Abbildung 3.21-3.22* dargestellt.

Tabelle 3.11: Ub-Proteinkonjugate und freies Ub in den Muskellysaten des Studienarms B (ohne Blutsperre) sowie MW \pm SD, n=15

Patient-Nr.	Ub-Proteinkonjugate (ng/ μ g Gesamtprotein)		Freies Ub (ng/ μ g Gesamtprotein)	
	B 0 min	B 60min	B 0 min	B 60 min
1	22,73	22,57	1,85	1,91
2	23,04	24,77	1,91	2,06
3	25,42	24,64	2,03	1,86
4	24,54	24,17	1,72	1,74
5	23,24	22,52	1,85	1,62
6	22,29	22,31	1,81	1,88
7	22,79	24,57	1,89	2,02
8	25,45	24,35	2,01	1,84
9	24,18	23,80	1,70	1,72
10	22,88	22,18	1,82	1,59
11	16,46	17,56	1,02	1,08
12	18,64	18,76	1,30	1,26
13	19,69	19,67	1,26	1,23
14	20,08	19,63	1,29	1,14
15	19,21	18,78	1,20	1,30
MW \pm SD	22,04 \pm 2,65	22,02 \pm 2,49	1,64 \pm 0,33	1,62 \pm 0,33

Abbildung 3.20: Endogenes Ubiquitin



- A) Immunoblot Detektionsergebnis der 0 und 60 Minuten Proben von fünf Patienten, 100 ng Ub-Standard (S), Molekulargewichtsmarker (M), Messbereich: Ub-Konjugate bzw. freies Ub;
 B) Ladekontrolle mit p44/42 MAP Kinase-Antikörpern (Erk1/2);
 C) „Ponceau S“-Färbung der Membran zur Darstellung der Gesamtproteinmenge der einzelnen Banden;

Abbildung 3.21: Ubiquitin-Proteinkonjugate der Muskellysate des Studienarms B (mit Blutsperre); MW \pm SD, n=15

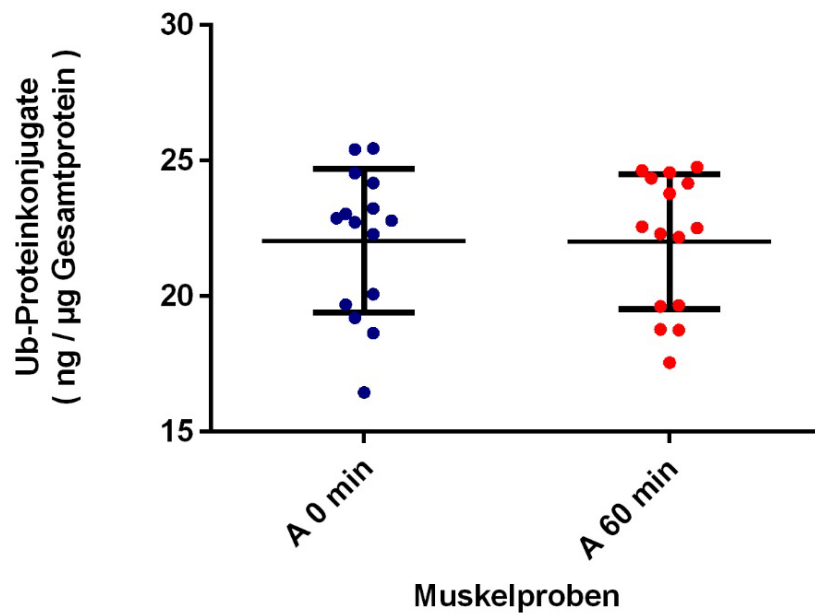
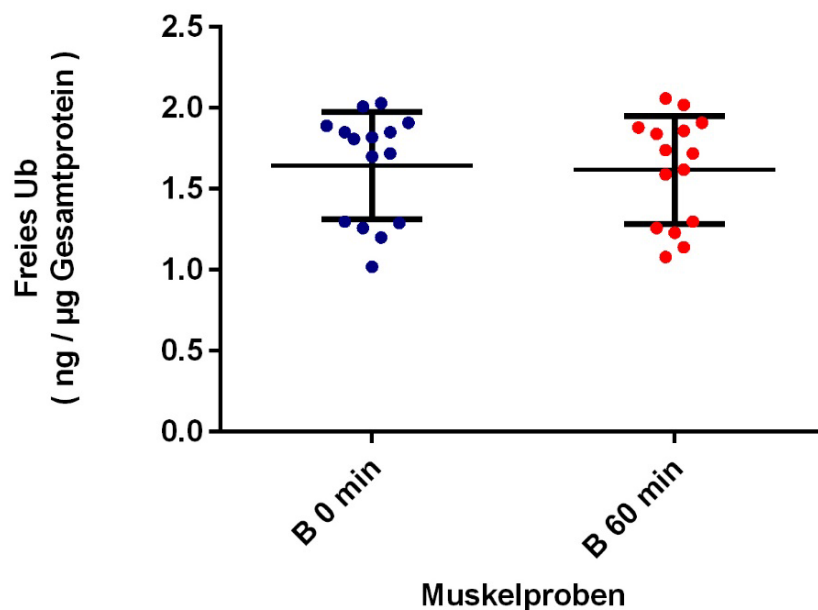


Abbildung 3.22: Freies Ubiquitin der Muskellysate des Studienarms B (mit Blutsperre); MW \pm SD, n=15



Im Studienarm B zeigten sich für die Ub-Proteinkonjugate in den Muskellysaten Mittelwerte von $22,04 \pm 2,65$ ng/µg Gesamtprotein (MW \pm SD) für die 0 Minuten Proben und $22,02 \pm 2,49$ ng/µg Gesamtprotein (MW \pm SD) für die 60 Minuten Proben bei einer Probenanzahl von n=15. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der 0 und 60 Minuten Probe ($p=0,98$).

Für das freie Ubiquitin in den Muskellysaten ergaben sich Mittelwerte von $1,64 \pm 0,33$ ng/ μ g Gesamtprotein (MW \pm SD) für die 0 Minuten Proben und $1,62 \pm 0,33$ ng/ μ g Gesamtprotein (MW \pm SD) für die 60 Minuten Proben bei einer Probenanzahl von $n=15$. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der 0 und 60 Minuten Probe ($p=0,82$).

3.4 Vergleich der Studienarme

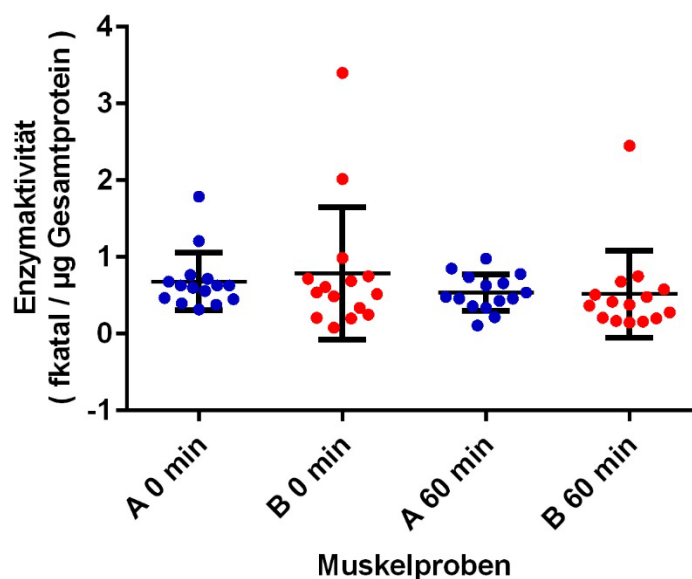
3.4.1 Ubiquitinierungsaktivität

Die mittleren Ubiquitinierungsaktivitäten der 0 und 60 Minuten Muskelproben der Studienarme A und B sind in *Tabelle 3.12* und *Abbildung 3.23* dargestellt.

Tabelle 3.12: Ubiquitinierungsaktivität der Muskellysate der Studienarme A und B; MW \pm SD bzw. p

Studienarm	Enzymaktivität (fkatal / μ g Gesamtprotein)		p
	0 min	60 min	
A	$0,68 \pm 0,37$	$0,54 \pm 0,24$	$p = 0,21$
B	$0,79 \pm 0,86$	$0,52 \pm 0,57$	$p = 0,32$
p	0,67	0,92	

Abbildung 3.23: Ubiquitinierungsaktivität der Muskellysate der Studienarme A und B; MW \pm SD, $n= 15$



Sowohl die 0 Minuten als auch die 60 Minuten Muskelproben zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studienarmen ($p=0,67$ bzw. $p=0,92$). In beiden Studienarmen zeigten sich zum Zeitpunkt 60 Minuten reduzierte Ubiquitinierungsaktivitäten, verglichen mit der Grundaktivität zum Zeitpunkt 0 Minuten. Diese erreichten aber keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,21$ im Studienarm A und $p=0,32$ im Studienarm B).

3.4.2 Proteasomenaktivität

Die Proteasomen-abhängigen Peptidaseaktivitäten (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-like) der 0 und 60 Minuten Muskelproben der Studienarme A und B sind in *Tabelle 3.13 dargestellt*

Tabelle 3.13: Proteasomen-abhängige Peptidaseaktivitäten (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-like) der 0 und 60 Minuten Proben der Studienarme A und B; MW \pm SD bzw. p

Studienarm	Caspase-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Chymotrypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Trypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]	
	0 min	60 min	0 min	60 min	0 min	60 min
A	0,14 \pm 0,04	0,15 \pm 0,05	0,92 \pm 0,24	0,98 \pm 0,34	0,21 \pm 0,07	0,26 \pm 0,06
B	0,11 \pm 0,06	0,09 \pm 0,03	0,72 \pm 0,30	0,61 \pm 0,21	0,17 \pm 0,12	0,16 \pm 0,03
P	0,1478	0,0006	0,0529	0,0010	0,2118	< 0,0001

Die Grundaktivität der Proteasomen-abhängigen Peptidasen zeigten zum Zeitpunkt 0 Minuten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Studienarm A mit Blutsperre und dem Studienarm B ohne Blutsperre:

- Caspase-ähnliche Aktivität: 0,14 \pm 0,04 und 0,11 \pm 0,06 pkat / mg Gesamtprotein (MW \pm SD; $p = 0,1478$)
- Chymotrypsin-ähnliche Aktivität: 0,92 \pm 0,24 und 0,72 \pm 0,30 pkat / mg Gesamtprotein (MW \pm SD; $p = 0,0529$)
- Trypsin-ähnliche Aktivität: 0,21 \pm 0,07 und 0,17 \pm 0,12 pkat / mg Gesamtprotein (MW \pm SD; $p = 0,2118$)

Nach 60 Minuten waren die Aktivitäten aller 3 gemessenen Proteasom-abhängigen Peptidasen im Studienarm A mit Blutsperre statistisch signifikant höher ($p < 0,001$) im Vergleich zum Studienarm B ohne Blutsperre (siehe *Abbildung 3.24-3.26*).

Abbildung 3.24: Proteasomen-abhängige Caspase-ähnliche Aktivität; MW \pm SD, n=15

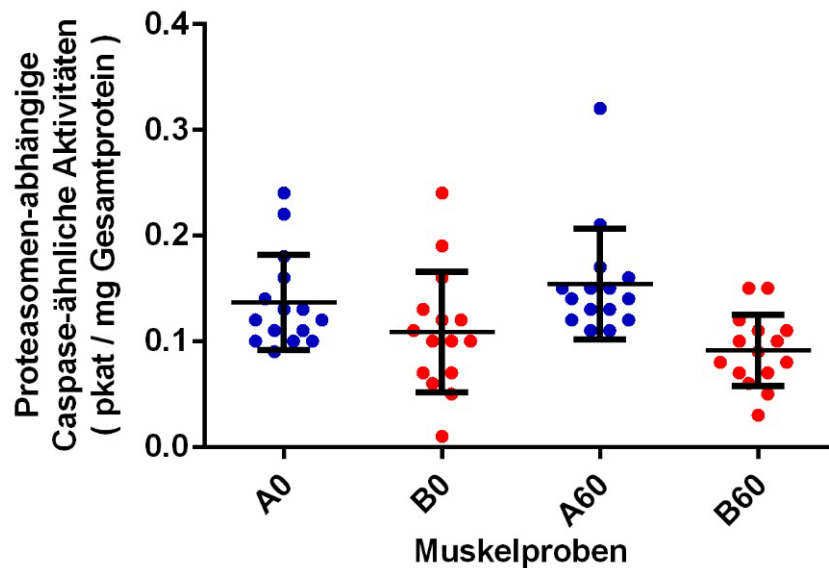


Abbildung 3.25: Proteasomen-abhängige Chymotrypsin-ähnliche Aktivität; MW \pm SD, n=15

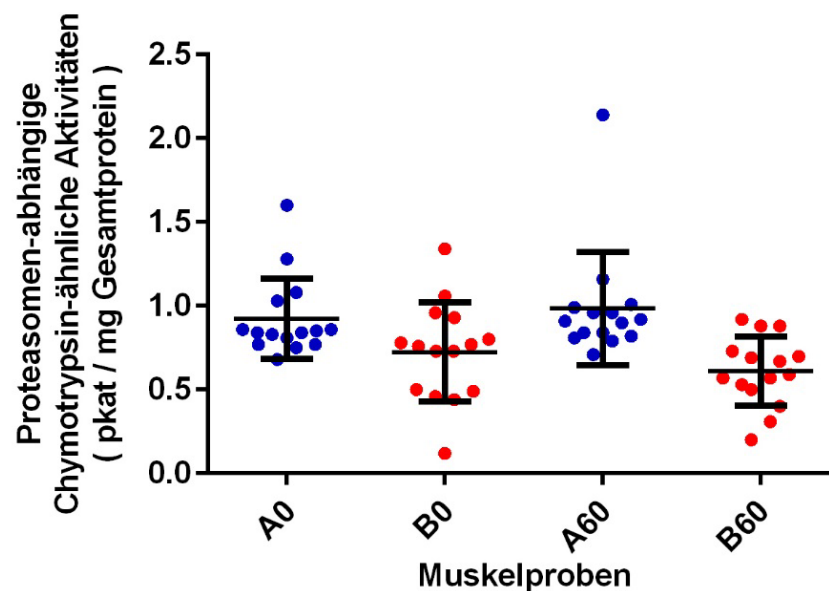
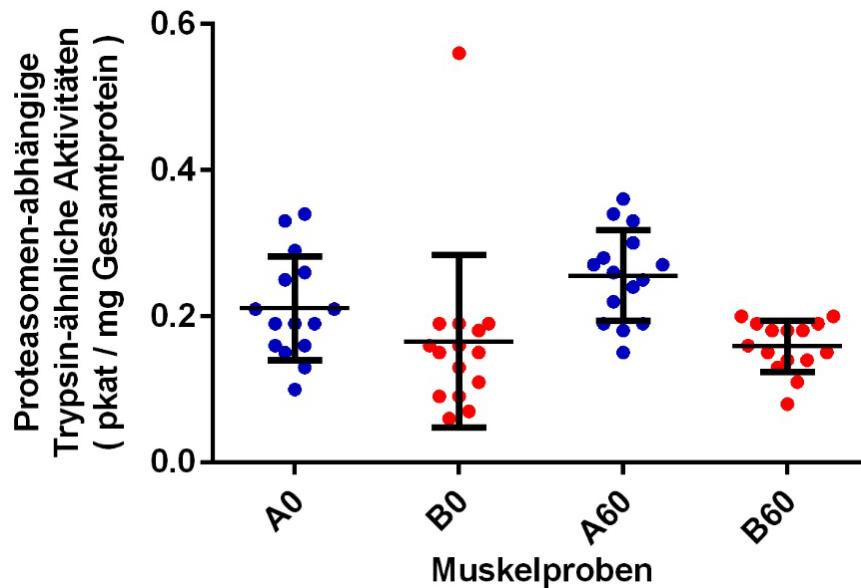


Abbildung 3.26: Proteasomen-abhängige Trypsin-ähnliche Aktivität;
MW \pm SD, n=15



Die Grundaktivität der Proteasomen-unabhängigen Peptidasen zum Zeitpunkt 0 Minuten zeigte zwischen Studienarm A mit Blutsperrung und Studienarm B ohne Blutsperrung keine signifikanten Unterschiede:

- Caspase-ähnliche Aktivität: 0.00 ± 0.00 und 0.00 ± 0.00 pkat / mg Gesamtprotein (MW \pm SD; $p = 0,299$)
- Chymotrypsin-ähnliche Aktivität: $0,19 \pm 0,06$ und $0,13 \pm 0,07$ pkat / mg Gesamtprotein (MW \pm SD; $p = 0,02$)
- Trypsin-ähnliche Aktivität: $0,82 \pm 0,28$ und $0,67 \pm 0,35$ pkat / mg Gesamtprotein (MW \pm SD; $p = 0,22$)

Die Aktivitäten der Proteasomen-unabhängigen Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlichen Peptidasen zum Zeitpunkt 60 Minuten waren statistisch signifikant höher im Studienarm A mit Blutsperrung im Vergleich zum Studienarm B ohne Blutsperrung ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0083$) (siehe *Tabelle 3.14* und *Abbildung 3.27-3.28*).

Tabelle 3.14: Proteasomen-unabhängige Peptidaseaktivitäten (Caspase-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche) der 0 und 60 Minuten Proben der Studienarme A und B; MW \pm SD bzw. p

Studienarm	Caspase-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Chymotrypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]		Trypsin-like [pkat/mg Gesamtprotein]	
	0 min	60 min	0 min	60 min	0 min	60 min
A	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,19 \pm 0,06	0,17 \pm 0,05	0,82 \pm 0,28	0,66 \pm 0,14
B	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,13 \pm 0,07	0,09 \pm 0,04	0,67 \pm 0,35	0,47 \pm 0,22
P			0,02	< 0,0001	0,2208	0,0083

Abbildung 3.27: Proteasomen-unabhängige Chymotrypsin-ähnliche Aktivität; MW \pm SD, n= 15

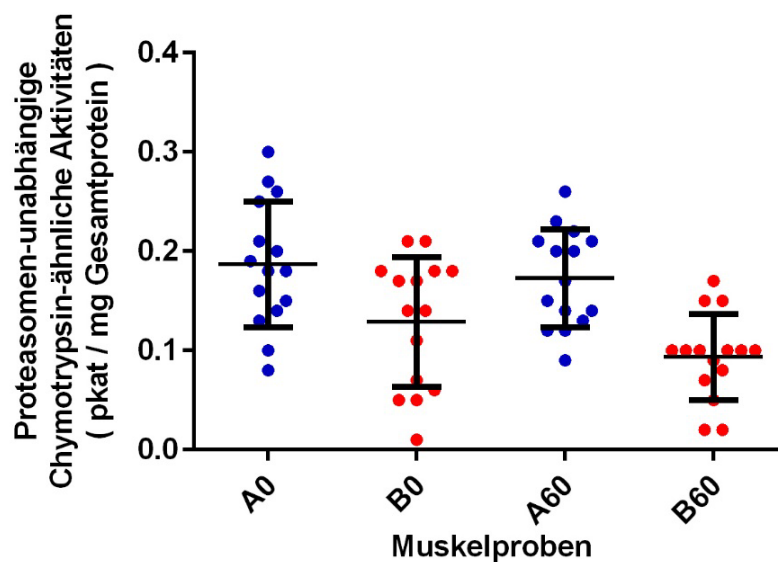
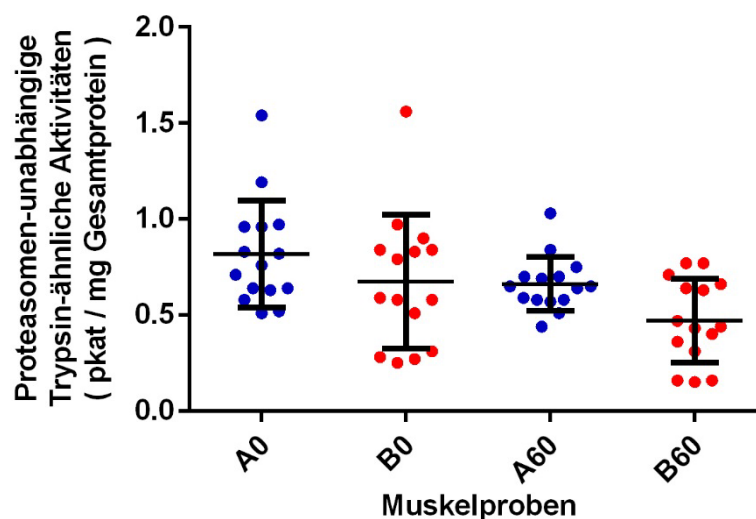


Abbildung 3.28: Proteasomen-unabhängige Trypsin-ähnliche Aktivität; MW \pm SD, n= 15



3.4.3 Endogenes Ubiquitin

Der Immunoblot und die nachfolgende densitometrische Messung des endogenen Ubiquitins ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studienarmen sowohl in den 0 als auch den 60 Minuten Muskelproben bezüglich der Konzentrationen des freien ($p = 0,54$ / $p = 0,80$) und konjugierten Ubiquitins ($p = 0,18$ / $p = 0,22$) (siehe *Tabelle 3.15-3.16* und *Abbildung 3.29-3.30*).

Die Gewebespiegel des freien und konjugierten Ubiquitins zeigten eine signifikante Korrelation zueinander ($r = 0,55$; $p < 0,001$).

Tabelle 3.15: Freies Ubiquitin der Muskellysate der Studienarme A und B in ng / μ g Gesamtprotein; MW \pm SD bzw. p

Studienarm	Freies Ubiquitin (ng)		p
	0 min	60 min	
A	1,55 \pm 0,48	1,58 \pm 0,50	$p = 0,88$
B	1,64 \pm 0,33	1,62 \pm 0,33	$p = 0,82$
p	0,54	0,80	

Abbildung 3.29: Messwerte des freies Ubiquitins der Muskellysate der Studienarme A und B; MW \pm SD, n=15

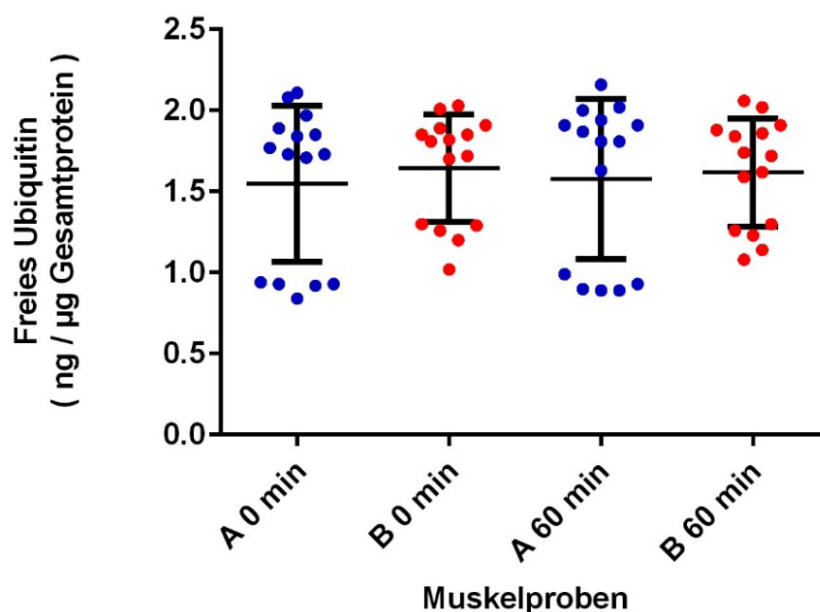
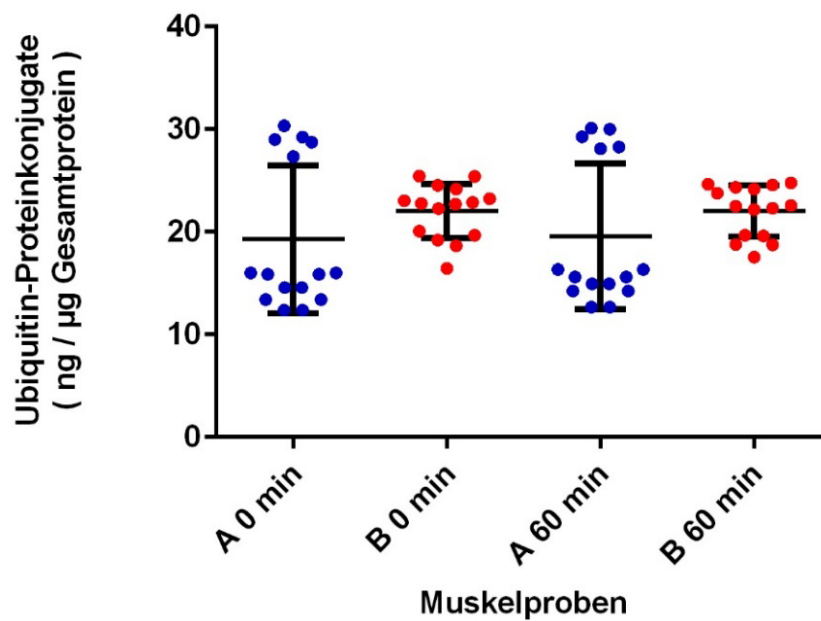


Tabelle 3.16: Ubiquitin-Proteinkonjugate der Muskellysate der Studienarme A und B in ng / μ g Gesamtprotein; MW \pm SD bzw. p

Studienarm	Konjugiertes Ubiquitin (ng)		p
	0 min	60 min	
A	19,29 \pm 7,19	19,56 \pm 7,12	p = 0,92
B	22,04 \pm 2,65	22,02 \pm 2,49	p = 0,98
p	p = 0,18	p = 0,22	

Abbildung 3.30: Ubiquitin-Proteinkonjugate der Muskellysate der Studienarme A und B; MW \pm SD, n=15



4 DISKUSSION

In der Literatur sind die Auswirkungen der mechanischen Blutsperre auf den Hauptproteinabbauweg der menschlichen Skelettmuskulatur noch nicht beschrieben worden. Nachdem zwei zuvor veröffentlichte Arbeiten [71, 82] sich mit den Auswirkungen von direkt traumatisierter Skelettmuskulatur auf das UPS befassten, versuchte diese aktuelle randomisierte Studie, die akuten Auswirkungen der Blutsperre während einer Knie-TEP Implantation auf freies bzw. konjugiertes Ubiquitin, Ubiquitinierungsaktivität, sowie Proteasomen-abhängige und -unabhängige Peptidaseaktivitäten in den Zellen des Musculus vastus medialis zu quantifizieren.

Seifert et al. [82] zeigte, dass es bei direkt mechanisch geschädigter menschlicher Skelettmuskulatur innerhalb von 8 Stunden nach Trauma zu einer Erniedrigung der Ubiquitinierungsaktivität kommt, bei gleichzeitig unveränderter Ubiquitinkonzentration und gesteigerter Proteasom-Peptidaseaktivität (tryptische, chymotryptische, caspase-ähnliche Aktivität).

Im Ratten-Tiermodell konnte Ponelies et al. [71] eine statistisch signifikante Reduktion der Ubiquitinierungsaktivität und der Proteasom-Peptidaseaktivität mit Steigerung der Konzentration des intrazellulären Ubiquitin direkt nach geschlossenem Weichteiltrauma nachweisen.

In der vorliegenden Studie waren in der Gruppe mit 60-minütiger Ischämiephase durch Verwendung der Blutsperre die Proteasomen-abhängigen und die Proteasomen-unabhängigen Peptidaseaktivitäten statistisch signifikant erhöht. In beiden Studienarmen zeigten sich zum Zeitpunkt 60 Minuten reduzierte Ubiquitinierungsaktivitäten, verglichen mit der Grundaktivität zum Zeitpunkt 0 Minuten. Diese erreichten aber keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Konzentrationen von freiem und konjugiertem Ub blieben unverändert.

Diese Beobachtungen lassen auf eine Aktivierung der molekularen Kaskaden des Muskelproteinabbaus schließen, was wiederum das Auftreten von Muskelatrophie nach Knie-TEP Operationen erklären könnte. Die o.g. Ergebnisse basieren auf einem menschlichen Modell der Skelettmuskelischämie. Aus diesem Grund können die Ergebnisse nicht unbedingt mit den bereits zuvor veröffentlichten Daten über direkt traumatisierte menschliche Skelettmuskulatur von Seifert et al. [82] und traumatisierte Skelettmuskulatur von Ratten von Ponelies et al. [71] vergleichbar sein. Ursachen für

Abweichungen können zum einen im unterschiedlichen Schädigungsmechanismus sowie im experimentellen Ablauf und der unterschiedlichen Zeitkinetik (1 Stunde in der aktuellen Studie im Vergleich von bis zu 48 Stunden in der Studie mit traumatisiertem Rattenskelettmuskel [71]) liegen.

Mittels Tierexperimenten an Ratten konnte von Fisher et al. [21] bereits eine reproduzierbare Reduktion des Gesamtproteingehalts innerhalb von 48 Stunden nach stumpfen Muskeltrauma sowie eine Erhöhung der proteolytischen Aktivitäten gezeigt werden. Farges et al. [17] zeigte ebenfalls an Tierexperimenten mit Ratten, dass es nach mechanischer Verletzung des Musculus gastrocnemius zu keiner Aktivierung der ATP verbrauchenden Proteasomen-abhängigen Abbauwege innerhalb von 48 Stunden kommt. Es zeigten sich unveränderte Proteasomenaktivitäten im Vergleich zur Kontrollgruppe in welcher Peptidaldehyd (MG 132) als reversibler Proteasomeninhibitor zum Einsatz kam. Stattdessen kam es zu einer gesteigerten Proteolyse durch lysosomalen Abbau.

In der vorliegenden Studie wurden die irreversiblen selektiven Proteasomeninhibitoren Epoxomicin und ADA zur Quantifizierung von Proteasomen-abhängigen und Proteasomen-unabhängigen Peptidaseaktivitäten verwendet. Frühere Studien [51, 71, 72, 82] zeigten bereits, dass die Verwendung von Epoxomicin und ADA für diesen Zweck als zuverlässig zu erachten ist.

Der Anstieg der Proteasomen-abhängigen und -unabhängigen Peptidaseaktivitäten in der Gruppe mit 60-minütiger Ischämiephase könnte eine Glukokortikoid-vermittelte Antwort auf den hypoxiebedingten zellulären Stress sein. Przygodda et al. [73] konnte mittels Tierexperimenten an Ratten einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Hypoxie und Glukokortikoid-vermittelter Aktivierung der Proteasomen-abhängigen und -unabhängigen Peptidaseaktivitäten nachweisen. Folglich könnte es zu einem gesteigerten Muskelproteinabbau kommen [79], was das Auftreten von Muskelatrophie nach Knie-TEP Operationen erklären könnte.

In der vorliegenden Studie zeigten sich statistisch nicht signifikante Veränderungen bezüglich der Ubiquitinierungsaktivität zwischen den verschiedenen Gruppen und Zeitpunkten. Eine erniedrigte Ubiquitinierungsaktivität wurde bereits in direkt

traumatisierter menschlicher Skelettmuskulatur [82], in menschlichen mononuklearen Zellen nach Endotoxin-Stimulation in vitro [52] und in menschlichen mononuklearen Zellen bei Sepsis [72] beobachtet. Der genaue Mechanismus der zu einer reduzierten Ubiquitinierungsaktivität führt, sowie ihre klinische Bedeutung wurden aber noch nicht abschließend geklärt. Allerdings scheint die Reduktion der Ubiquitinierungsrate, eine regulatorische Zellantwort auf eine Entzündungsreaktion im Allgemeinen zu sein, mit dem Ziel, den Proteinabbau [82] zu begrenzen.

Dass eine starke Regulierung der Ubiquitin-Spiegel insbesondere des freien cytosolischen Ubiquitins, für den Zellstoffwechsel essentiell zu sein scheint, zeigten schon frühere Studien [3, 22, 64, 82]. Die Daten der vorliegenden Studie stützen diese Hypothese, da die Muskelgewebekonzentrationen von freiem und konjugiertem Ubiquitin signifikant miteinander korrelierten. Das berechnete Verhältnis von konjugiertem zu freiem Ubiquitin, blieb sowohl mit als auch ohne die Verwendung der Blutsperre konstant.

Während sich das wissenschaftliche Interesse bisher hauptsächlich auf den Ubiquitinierungsprozess richtete [78], blieb die Bedeutung der Deubiquitinierungsenzyme im Skelettmuskel in Bezug auf Ischämie unklar. Die Wirkungen der durch die Blutsperre induzierten Ischämie während der Knie-TEP Implantation auf den Hauptproteinabbauweg (UPS) im humanen Skelettmuskel wurde nun beschrieben. Jedoch hat die vorliegende Studie einige Einschränkungen. Die Stichprobengröße fällt mit $n = 30$ gering aus, jedoch rechtfertigte die Power-Analyse diese. Es bleibt unklar, ob es sich bei den Veränderungen der biochemischen Parameter in den Muskelzellen nur um einen vorübergehenden - aufgrund der Anwendung der Blutsperre - oder dauerhaften über die Beendigung der Blutsperre hinaus bestehenden Zustand handelt. Des Weiteren kann aufgrund der Nähe der Muskelbiopsien zum Operationsfeld nicht sichergestellt werden, dass es sich um rein ischämiebedingte Auswirkungen handelt. Ein Indiz hierfür könnte die in beiden Studienarmen tendenziell erniedrigte Ubiquitinierungsaktivität sein. In den Studien mit traumatisierter Skelettmuskulatur war diese signifikant erniedrigt [71, 82]. Da sich dieses Phänomen in der vorliegenden Studie nicht durch die Blutsperreanwendung erklären lässt, könnte dies ein Hinweis für eine systemische Reaktion im Rahmen des Operationstraumas sein. Eine systemische Aktivierung des UPS u.a. nach

Verbrennungen, Schädel-Hirn- und Muskeltraumata wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen [15, 53, 71].

Nach Knie-TEP Operationen ist die Stärke des Musculus quadriceps femoris der entscheidende Faktor für die physische Kniefunktion [56]. Durch die Verwendung von MRT Aufnahmen zur Vermessung von Muskelvolumina zeigte sich eine Reduzierung des Quadricepsvolumens um 12% für die unter Blutsperre mit Knie-TEP versorgten Extremitäten, wohingegen die kontralateralen nicht operierten Extremitäten sich nur um 6% innerhalb von zwei Wochen postoperativ reduzierten [74]. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass der Musculus quadriceps zwei Monate nach Knie-TEP Implantation deutlich schwächer im Vergleich zu altersgleichen gesunden Kontrollgruppen ist [61]. Douglas A. Dennis et al. [10] führten eine randomisierte Studie mit insgesamt 28 Patienten mit bilateraler Knie-TEP Versorgung durch. Bei den Patienten, die unter Blutsperre operiert wurden, zeigte sich eine Abnahme der Muskelkraft des Musculus quadriceps innerhalb der ersten drei postoperativen Monate.

In verschiedenen Tiermodellen wurde bereits gezeigt, dass es im Rahmen der Blutsperreanwendung zu kompressions- und ischämiebedingten pathologischen neuromuskulären Veränderungen kommt [60, 66, 68, 81, 87]. Die Arbeit von Jacobson et al. ergab, dass nach zweistündiger Blutsperreanwendung eine Reduktion der muskulären Kontraktilitätsfähigkeit eintritt [33, 46]. Des Weiteren wurde eine Reduktion der Nervenleitungsgeschwindigkeit [39, 76, 87], sowie eine axonale Degeneration zwei Stunden nach Anlage einer Blutsperre mit einem Manschettendruck von 350 mmHg beobachtet [67]. Dies könnte die Abnahme von Muskelvolumen und Muskelkraft erklären. Aufgrund des Nachweises von ischämiebedingten regionalen Muskelgewebsnekrosen distal der Blutsperre wurde für längere Blutsperrezeiten eine 10 minutige Reperfusionspause während des Eingriffes empfohlen [65].

Westman et al. [90] entnahmen bei Knie-TEP Operationen mit Blutsperreanwendung Biopsien (n = 15) vom Musculus quadriceps femoris präoperativ und zum Zeitpunkt maximaler Ischämie. Sie beobachteten eine deutliche durch Ischämie induzierte Erhöhung des Muskellactats (400%), und des Kreatins (91%), sowie eine Gesamtzunahme der freien Aminosäurenkonzentration. Mehrere metabolische Veränderungen wie z.B. ein vermindertes pH-Niveau [83], eine erhöhte Glycogenolyse

[83], sowie reaktive Sauerstoffverbindungen [7, 54] konnten mit durch Blutsperre induzierter Ischämie und nachfolgender Reperfusion in Zusammenhang gebracht werden.

In einer aktuellen Studie [74] wurde gezeigt, dass Ischämie und Reperfusion in betroffenen Skelettmuskeln während primären Knie-TEP Implantationen zu einer Änderung der Hauptregulatoren der Translation führt, was eine Verringerung der Proteinsynthese zur Folge haben kann.

Neben den eben genannten (eher pathophysiologischen) Folgen der Blutsperreanwendung finden sich in der Literatur bezüglich der klinischen Vor- und Nachteile der Blutsperre konträre Meinungen.

Die Befürworter der Blutsperre verweisen auf die möglichen Vorteile wie die Reduzierung des intraoperativen Blutverlustes [2, 12, 13, 29, 35, 45, 62, 84, 85, 96, 98], des Gesamtblutverlustes [2, 13, 55], und des Bedarfs an Bluttransfusionen [35, 96], eine bessere Darstellung anatomischer Strukturen im Operationsgebiet [13, 84], eine Verbesserung der Implantat-Knochen-Zementierung [13, 96] sowie die Verkürzung der Operationszeit [35, 85, 96, 98]. Aufgrund dessen gehört die Verwendung der Blutsperre zur üblichen Praxis bei orthopädischen und unfallchirurgischen Operationen [41, 44, 48].

Die Kritiker der Blutsperre nennen als mögliche Nachteile des Verfahrens einen erhöhten post- bzw. perioperativen operativen Blutverlust [45, 96], ein höheres Risiko für thromboembolische Komplikationen (z.B. tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien) [29, 35, 62, 84, 85, 96, 98], Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen [35, 84, 96], sowie ein vermehrtes subjektives Schmerzempfinden [12, 13, 43, 47], ein erhöhter Schmerzmittelverbrauch innerhalb der frühen postoperativen Phase (1.– 4. Stunde) [13], einen längeren Krankenhausaufenthalt [14], eine schlechtere postoperative Beugefähigkeit [12, 35, 43, 98], sowie eine langsamere funktionelle Erholung postoperativ [35, 96, 98].

In der aktuellen Literatur wurden allerdings einige Argumente sowohl auf Seiten der Befürworter als auch der Kritiker relativiert. So fanden sich in einigen Studien keine signifikanten Unterschiede bezüglich des postoperativen Blutverlustes [35, 84], des Gesamtblutverlustes [29, 35, 45, 84, 96], des Bedarfs an Bluttransfusionen [12, 13, 29, 55, 84, 96, 98, 99], der Operationsdauer [2, 12, 13, 45, 84], der besseren Darstellung anatomischer Strukturen im Operationsfeld [12], des Auftretens von

thromboembolischen Komplikationen [2, 13, 45], Nervenschäden, Gefäßverletzungen, lokale Weichteilschäden, Wundheilungsstörungen oder Infekten [13]. Auch hinsichtlich der Krankenhausaufenthaltsdauer [13, 29, 35, 84] und der postoperativen Beugefähigkeit [13, 47, 62] ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede finden.

In der Literatur finden sich verschiedene Methoden zur Bestimmung eines optimalen Manschettendruckes. Um das Risiko für mögliche Komplikationen so gering wie möglich zu halten, sollte auf die standardmäßige Verwendung von fest definierten Drücken (meist 200 - 250 mmHg am Oberarm und 300 - 350 mmHg am Oberschenkel [9, 36]) verzichtet werden. Stattdessen sollten die Drücke zumindest an den systolischen Blutdruck des Patienten adaptiert werden. Diese sollten bei Operationen an der oberen Extremität ca. 50-100 mmHg über dem präoperativ gemessenen systolischen Blutdruck liegen und bei Operationen an der unteren Extremität 100-150 mmHg darüber [9, 14, 36].

Effektiver zur Reduzierung des Manschettendruckes ist die Bestimmung des Extremitätenverschlussdruckes (LOP - „limb occlusion pressure“) mittels Dopplersonographie, da auf tiefer liegende Gewebe ein geringerer Druck wirkt als an der Manschette anliegt. Bei einem gemessenen LOP von <130 mmHg wird der Manschettendruck aus Sicherheitsgründen, um Blutdruckschwankungen abzufangen um weitere 40 mmHg angehoben. Bei einem LOP zwischen 131-190 mmHg um zusätzliche 60 mmHg und bei LOPs >190 mmHg um weitere 80mmHg. Dadurch reichen bei jungen und gesunden Patienten Manschettendrücke unterhalb von 200 mmHg was u.a. das Risiko für Haut-, Muskel-, Nerven- und Gefäßschäden reduziert [9].

Als weiteres Verfahren zur Bestimmung eines möglichst niedrigen aber noch ausreichenden Manschettendruckes gibt es die Möglichkeit der Berechnung des kleinsten arteriellen Verschlussdruckes (AOP – „arterial occlusion pressure“) mittels einer Formel in welche sowohl systolischer als auch diastolischer Blutdruck, sowie Extremitätenumfang und Manschettenbreite in cm mit einfließen.

$$AOP = \frac{(sys. Blutdruck - dias. Blutdruck) \times Extremitätenumfang}{3 \times Manschettenbreite} + dias. Blutdruck$$

Der so berechnete AOP wird dann um 50-75 mmHg angehoben. Dadurch lässt sich bei Erwachsenen der Manschettendruck um 20-40% senken, bei Kindern sogar um bis zu 50% [14].

Durch den erzeugten Druck werden die arteriellen und venösen Gefäße komprimiert und der Blutfluss unterbrochen. Die kontinuierliche Blutsperrezeit sollte 2 Stunden nicht überschreiten [9, 36]. Sollte die Operation länger dauern und ein blutfreies Operationsfeld benötigt werden kann nach einer Reperfusionsdauer von 10-15 Minuten die Blutsperre erneut angelegt werden [9, 36]. Während der Reperfusion sollten mit einer sterilen Wundauflage kontinuierlich Druck auf den Schnitt ausgeübt werden. Je nach Wunsch des Operateurs gibt es verschiedene Möglichkeiten der Verwendung der Blutsperre. Meistens wird sie vor dem Hautschnitt geschlossen und nach Anlage des Verbandes wieder geöffnet. Alternativ kann die Blutsperre bereits nach der Zementierung wieder geöffnet werden. Als weitere Methode besteht die Möglichkeit nur für den Zeitraum der Zementierung die Blutsperre anzulegen [13] was die Ischämiezeit erheblich verkürzt, und somit das Risiko für Komplikationen minimiert.

Zum ersten Mal wurde die Knie-TEP Implantation als klinisches Modell verwendet, um die Rolle des UPS in menschlichen Skelettmuskelzellen während einer durch Blutsperre induzierten Ischämie zu erforschen. Diese Studie liefert den Nachweis für Tourniquet assoziierte UPS-Änderungen, die mit Proteinabbau und klinisch relevanter Muskelatrophie nach Knie-TEP einhergehen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Rolle des UPS als ein potentiell therapeutisches Ziel zur Vermeidung von Ischämie-induzierten Muskelschäden aufzuklären. Diese Daten könnten dazu beitragen, das Bewusstsein über die Risiken der Tourniquet-Anwendung auf molekularer Ebene zu schärfen. Vor einer Überarbeitung der Empfehlungen zur Verwendung der Blutsperre während orthopädischen und unfallchirurgischen Operationen, ist jedoch weitere Forschung notwendig, um die kurz- und langfristige klinische Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse zu quantifizieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Da aktuelle Daten eine reduzierte postoperative Quadricepsmuskelkraft nach Verwendung einer Blutsperre im Rahmen einer Knie-TEP-Implantation suggerieren, und das klinisch-funktionelle Outcome nach Knie-TEP unmittelbar mit der Masse und Kraft der kniegelenksübergreifenden Muskulatur zusammenhängt, stellte sich die Frage nach den molekularen Effekten der häufig angewandten intraoperativen Blutsperre / Ischämie auf den Proteinstoffwechsel der Skelettmuskulatur, die zum Zeitpunkt der Studienplanung unbekannt waren. Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) repräsentiert eine der Hauptstoffwechselwege zur Muskelproteindegradation. Die Hypothese der vorliegenden Studie beinhaltet, dass die Blutsperre im Rahmen der Knie-TEP-Implantation zu Veränderungen im UPS der Skelettmuskelzellen führt, vereinbar mit einer vermehrten Proteindegradation und dadurch folgender Muskelatrophie. Hierfür wurden die Auswirkungen der Blutsperre auf die Konzentration von freiem und konjugiertem Ubiquitin (Ub), die Ubiquitinierungsrate und die Proteasomen-abhängigen und -unabhängigen Peptidaseaktivitäten in Zellen des Musculus vastus medialis analysiert. 30 elektive Knie-TEP Patienten wurden in eine randomisierte, kontrollierte und monozentrische Studie eingeschlossen und mit schriftlicher Einwilligung randomisiert der Gruppe A (OP mit Blutsperre, n = 15) oder der Gruppe B (OP ohne Blutsperre, n = 15) zugeteilt. Muskelbiopsien (5x5x5 mm) wurden aus dem Musculus vastus medialis unmittelbar nach Anlage des chirurgischen Zugangs und exakt 60 min nach Entnahme der ersten Muskelprobe gewonnen und sofort mittels Flüssigstickstoff konserviert. Es erfolgte die Bestimmung der cytosolischen Konzentrationen von freiem und konjugiertem Ub mittels Western-Blot-Analysen. Unter Verwendung einer Enzymkinetik wurde die Ubiquitinierungsrate (Ubiquitin-Protein konjugierende Aktivität) ermittelt. Die Quantifizierung der Proteasomen-abhängigen und -unabhängigen Peptidaseaktivitäten erfolgte mittels Peptidase-Assay. Die Konzentrationen von freiem und konjugiertem Ub sowie die Ubiquitinierungsraten wurden durch die Blutsperre nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis stützt die in der Literatur beschriebene These, dass eine strenge Regulation der intrazellulären Ub-Konzentrationen essentiell für den Zellstoffwechsel ist. Die Blutsperre induziert eine signifikante Steigerung der Proteasomen-abhängigen und -unabhängigen Peptidaseaktivitäten, mit möglicher konsekutiver Muskelproteindegradation und postoperativer Muskelatrophie.

6 ANHANG

6.1 Chemikalien

Ada-(Ahx) ₃ -(Leu) ₃ -VS	Biomol GmbH, Hamburg
Anti-Ubiquitin (developed in rabbit whole antiserum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ATP (Adenosintriphosphat, 100 mM, pH 7)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Biotinylated Protein Ladder	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Biotinylated Ubiquitin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
D-PBS (CaCl ₂ , MgCl ₂)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DTT (Dithiothreitol, 100 mM)	Promega Corp., Madison, USA
EDTA (Gibco, UltraPure 0,5 M)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Epoxomicin (Biomol, 100 µg; MG 554.7)	Biomol GmbH, Hamburg
Essigsäure 99 - 100% technisch	Merck KGaA, Darmstadt
Glycine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
H ₂ O, Water, 0,1 µm filtered, DNase- / RNase-free	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HRP-conjugated Anti-Biotin Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Methanol (rein)	Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MgCl ₂	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NuPage MES SDS Running Buffer 20x	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage Novex 4 - 12 % Bis-Tris Gel 1.5 / 15 well	Invitrogen, Carlsbad, USA

P44/42 MAP Kinase Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Peroxidase-conjugated Affini Pure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
PhastGel Blue R 350	Amersham Biosciences (SF), Corp., Piscataway, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphate Buffered Saline, pH 7,4 with Tween 20 (PBS/T)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteasome Inhibitor II / C-L (Z-LLE-AMC)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Proteasome Inhibitor III / CT-L (Suc-LLVY-AMC)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Proteasome Inhibitor VI / T-L (Z-ARR-AMC)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Sample Buffer, Lämmli 2x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Rockford, USA
StartingBlock Blocking Buffer in PBS	Thermo Scientific, Rockford, USA
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity	Substrate Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA
Trizma Base (Trishydroxymethylaminomethane)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris/Cl, pH 8	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
----------	---

Ubiquitin from bovine Erythrocytes	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
------------------------------------	---

6.2 Geräte und Utensilien

Blockthermostat BT 200	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden
------------------------	---

Centrifuge Tubes 11x34 mm	Beckmann Instruments, USA, Inc., Palo Alto
---------------------------	---

Chemi-Smart 5000	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
------------------	-----------------------------------

CryoTube Vials 1,8 ml	Nunc A/S, Roskilde, Denmark
-----------------------	-----------------------------

Electrophoresis Power Supply EPS3501XL	Amersham Biosciences (SF), Corp., Piscataway, USA
---	--

Feinwaage MC1 Laboratory LC 620 S	Sartorius AG, Göttingen
-----------------------------------	-------------------------

Filter-Paper Model 583 Gel-Dryer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
----------------------------------	-------------------------------------

GENios Spectra Fluor Plus Microplatereader	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim
---	---------------------------------------

Homogenisator 20, Duall mit Glaspistill, konisch, Abstand 0.1-0.15 mm, Inhalt 1 ml	Kontes Glass Co., Vineland, USA
---	---------------------------------

Immuno-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting (0.2 µm)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
--	-------------------------------------

Hoefer Transphor +4 Cassettes & Cooler	Amersham Biosciences (SF), Corp., Piscataway, USA
--	--

Hoefer Transphor Power Lid TE 50X	Amersham Biosciences (SF), Corp., Piscataway, USA
-----------------------------------	--

Mikroplatten 96 Well Polystyrol, U-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
--	--

Mikroplatten 96 Well Polystyrol, F-Boden, Fluotrac 200	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
---	--

Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
---------------------------------	--

Plattformschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Polystat CC1-K6	Peter Huber Kältemaschinen, Offenburg
PURELAB Classic	ELGA LabWater, VWS Deutschland GmbH, Celle
Sorvall Discovery 100SE	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Sorvall T-8100 Fixed Angle Rotor	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Wasserbad WB14	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
XCell SureLock / Novex Mini Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg

6.3 Software

Chemi-Capt, Version 15.01	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
G*Power, Version 3.1.9.2	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf http://www.gpower.hhu.de/
GraphPad Prism, Version 5.02	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
ImageMaster TotalLab, Version 1.11	Amersham Biosciences (SF), Corp., Piscataway, USA
JMP, Version 11.0.0	SAS Institute GmbH, Böblingen
Magellan, Version 2.5	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim
Microsoft Excel, Version 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA

6.4 Hergestellte Lösungen

Adenosintriphosphat ATP (10 mM)

Das aliquotierte und bei -20 °C gelagerte ATP (100 mM) wurde vor der Ubiquitinierungsreaktion mit H₂O 1:10 zu einer 10 mM Lösung verdünnt.

Aqua dest.

Für die Versuche wurde destilliertes Wasser mit der Reinstwasseranlage PURELAB Classic der Firma ELGA LabWater hergestellt.

Blockpuffer

Zur Herstellung des Blockpuffers wurden 1.000 ml „*StartingBlock*“-Pufferlösung mit 500 µl Tween 20 vermischt.

Coomassie-Blue

Für die Herstellung von Coomassie-Blue wurde eine Tablette PhastGel Blue R 350 in 80 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wurden 120 ml Methanol (100%) hinzugegeben, die Lösung filtriert und 200 ml Essigsäure (20%) zupipettiert.

Entfärbelösung

In 1000 ml Aqua dest. wurden 50 ml (5%) Methanol und 75 ml (7,5%) Essigsäure zur Herstellung der Entfärbelösung gelöst.

Lysepuffer

Hierfür wurden 3 mM KH₂PO₄ und 3 mM K₂HPO₄ pH 7,4 in Aqua dest. vermischt.

MES-SDS-Laufpuffer (1x)

Zur Herstellung des Laufpuffers (1x) wurden 50 ml NuPage MES SDS Running Buffer (20x) in 950 ml Aqua dest. gelöst.

Molekulargewichtsmarker

Für den biotinylierten Molekulargewichtsmarker wurde der Biotinylated SDS Molecular Weight Standard in 1 ml Lämmli-Puffer gelöst und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Es

wurden jeweils 1 µl des so hergestellten Markers mit 5 µl Lämmli- Puffer (2x) und 4 µl des verwendeten Laufpuffers vermischt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Proteasomenassay-Puffer

Für die Herstellung des Proteasomenassay-Puffers wurden 2 ml Tris/Cl (1 M, pH8), 0,2 ml MgCl₂ (1 M), 0,4 ml Dithiothreitol (DTT; 100 mM), 2 ml ATP (100 mM) und 35,4 ml Aqua dest. vermischt.

Reaktionspuffer (10x) für die Ubiquitinierung

Zur Herstellung des Reaktionspuffers wurden 500 mM Tris/Cl pH 8, 50 mM MgCl₂, und 10 mM DTE vermischt und mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt.

Transferpuffer

Für den Transferpuffer wurden 144 g Glycin und 30 g Trizma-Base in 8 l Aqua dest. sowie 2 l Methanol gelöst.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. AQUA - Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH: 17/5 – Knie-Totalendoprothese-Erstimplantation - Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2014, <https://www.aqua-institut.de>, 2015
2. Alcelik, I, Pollock, RD, Sukeik, M, Bettany-Saltikov, J, Armstrong, PM, Fismer, P: A comparison of outcomes with and without a tourniquet in total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Arthroplasty*, 27: 331-340, 2012.
3. Amerik, AY, Nowak, J, Swaminathan, S, Hochstrasser, M: The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Molecular biology of the cell*, 11: 3365-3380, 2000.
4. Baumeister, W, Walz, J, Zuhl, F, Seemuller, E: The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92: 367-380, 1998.
5. Bhattacharyya, S, Yu, H, Mim, C, Matouschek, A: Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15: 122-133, 2014.
6. Chang, HR, Bistrian, B: The role of cytokines in the catabolic consequences of infection and injury. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*, 22: 156-166, 1998.
7. Cheng, YJ, Chien, CT, Chen, CF: Oxidative stress in bilateral total knee replacement, under ischaemic tourniquet. *J Bone Joint Surg Br*, 85: 679-682, 2003.
8. Ciechanover, A, Finley, D, Varshavsky, A: Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*, 37: 57-66, 1984.
9. Deloughry JL, GR: Arterial tourniquets. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, Volume 9, 2009.
10. Dennis, DA, Kittelson, AJ, Yang, CC, Miner, TM, Kim, RH, Stevens-Lapsley, JE: Does Tourniquet Use in TKA Affect Recovery of Lower Extremity Strength and Function? A Randomized Trial. *Clin Orthop Relat Res*, 2015.
11. Dripps, R: New classification of physical status. *Anesthesiology*, 24:111, 1963.
12. Ejaz, A, Laursen, AC, Kappel, A, Laursen, MB, Jakobsen, T, Rasmussen, S, Nielsen, PT: Faster recovery without the use of a tourniquet in total knee arthroplasty. *Acta orthopaedica*, 85: 422-426, 2014.

13. Endres, SS, D.; Wilke, A.;: Effects of tourniquet in total knee arthroplasty with regard to functional outcome and complications. *OUP - Deutscher Ärzte-Verlag*, 11: 510-516, 2013.
14. Estebe, JP, Davies, JM, Richebe, P: The pneumatic tourniquet: mechanical, ischaemia-reperfusion and systemic effects. *Eur J Anaesthesiol*, 28: 404-411, 2011.
15. Fang, CH, Li, BG, James, JH, King, JK, Evenson, AR, Warden, GD, Hasselgren, PO: Protein breakdown in muscle from burned rats is blocked by insulin-like growth factor i and glycogen synthase kinase-3beta inhibitors. *Endocrinology*, 146: 3141-3149, 2005.
16. Fang, S, Weissman, AM: A field guide to ubiquitylation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61: 1546-1561, 2004.
17. Farges, MC, Balcerzak, D, Fisher, BD, Attaix, D, Bechet, D, Ferrara, M, Baracos, VE: Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*, 282: E326-335, 2002.
18. Finch, E, Walsh, M, Thomas, SG, Woodhouse, LJ: Functional ability perceived by individuals following total knee arthroplasty compared to age-matched individuals without knee disability. *J Orthop Sports Phys Ther*, 27: 255-263, 1998.
19. Finley, D, Ciechanover, A, Varshavsky, A: Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*, 37: 43-55, 1984.
20. Fischer, D, Sun, X, Gang, G, Pritts, T, Hasselgren, PO: The gene expression of ubiquitin ligase E3alpha is upregulated in skeletal muscle during sepsis in rats-potential role of glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun*, 267: 504-508, 2000.
21. Fisher, BD, Baracos, VE, Shnitka, TK, Mendryk, SW, Reid, DC: Ultrastructural events following acute muscle trauma. *Medicine and science in sports and exercise*, 22: 185-193, 1990.
22. Hanna, J, Leggett, DS, Finley, D: Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Molecular and cellular biology*, 23: 9251-9261, 2003.
23. Harris, LW, Shadgan, B, Reid, D, Powers, SK, O'Brien, PJ: Tourniquet-induced skeletal muscle oxidative injury during lower limb orthopaedic trauma surgery. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 93-B: 557, 2011.
24. Hasselgren, PO: Catabolic response to stress and injury: implications for regulation. *World journal of surgery*, 24: 1452-1459, 2000.
25. Hasselgren, PO: Glucocorticoids and muscle catabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 2: 201-205, 1999.

26. Hasselgren, PO, Fischer, JE: Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg*, 233: 9-17, 2001.
27. Hasselgren, PO, Fischer, JE: The ubiquitin-proteasome pathway: review of a novel intracellular mechanism of muscle protein breakdown during sepsis and other catabolic conditions. *Ann Surg*, 225: 307-316, 1997.
28. Hasselgren, PO, Wray, C, Mammen, J: Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1-10, 2002.
29. He, T, Cao, L, Yang, DS, A, DL, Xu, BY, Li, GQ, Chen, H, Zeng, Y: [A meta-analysis for the efficacy and safety of tourniquet in total knee arthroplasty]. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*, 49: 551-557, 2011.
30. Hershko, A, Ciechanover, A: The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67: 425-479, 1998.
31. Hershko, A, Heller, H, Elias, S, Ciechanover, A: Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *The Journal of biological chemistry*, 258: 8206-8214, 1983.
32. Hochstrasser, M: Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics*, 30: 405-439, 1996.
33. Jacobson, MD, Pedowitz, RA, Oyama, BK, Tryon, B, Gershuni, DH: Muscle functional deficits after tourniquet ischemia. *The American journal of sports medicine*, 22: 372-377, 1994.
34. Jagoe, RT, Goldberg, AL: What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 4: 183-190, 2001.
35. Jiang, FZ, Zhong, HM, Hong, YC, Zhao, GF: Use of a tourniquet in total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*, 20: 110-123, 2015.
36. Kam, PC, Kavanagh, R, Yoong, FF: The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia*, 56: 534-545, 2001.
37. Kellgren, JH, Lawrence, JS: Radiological assessment of osteo-arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 16: 494-502, 1957.
38. Koegl, M, Hoppe, T, Schlenker, S, Ulrich, HD, Mayer, TU, Jentsch, S: A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 96: 635-644, 1999.
39. Krebs, DE: Isokinetic, electrophysiologic, and clinical function relationships following tourniquet-aided knee arthroscopy. *Phys Ther*, 69: 803-815, 1989.

40. Kunjappu, MJ, Hochstrasser, M: Assembly of the 20S proteasome. *Biochimica et biophysica acta*, 1843: 2-12, 2014.
41. Kvederas, G, Porvaneckas, N, Andrijauskas, A, Svensen, CH, Ivaskevicius, J, Mazunaitis, J, Marmaite, U, Andrijauskas, P: A randomized double-blind clinical trial of tourniquet application strategies for total knee arthroplasty. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 21: 2790-2799, 2013.
42. Lam, YA, Lawson, TG, Velayutham, M, Zweier, JL, Pickart, CM: A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*, 416: 763-767, 2002.
43. Ledin, H, Aspenberg, P, Good, L: Tourniquet use in total knee replacement does not improve fixation, but appears to reduce final range of motion. *Acta orthopaedica*, 83: 499-503, 2012.
44. Li, C, Zeng, Y, Shen, B, Kang, P, Yang, J, Zhou, Z, Pei, F: A meta-analysis of minimally invasive and conventional medial parapatella approaches for primary total knee arthroplasty. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 23: 1971-1985, 2015.
45. Li, X, Yin, L, Chen, ZY, Zhu, L, Wang, HL, Chen, W, Yang, G, Zhang, YZ: The effect of tourniquet use in total knee arthroplasty: grading the evidence through an updated meta-analysis of randomized, controlled trials. *European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie*, 2013.
46. Lieber, RL, Pedowitz, RA, Friden, J, Gershuni, DH: Decreased muscle speed, strength and fatigability following two hours of tourniquet-induced ischaemia. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 26: 127-132, 1992.
47. Liu, D, Graham, D, Gillies, K, Gillies, RM: Effects of tourniquet use on quadriceps function and pain in total knee arthroplasty. *Knee surgery & related research*, 26: 207-213, 2014.
48. Lohmann-Jensen, R, Holsgaard-Larsen, A, Emmeluth, C, Overgaard, S, Jensen, C: The efficacy of tourniquet assisted total knee arthroplasty on patient-reported and performance-based physical function: a randomized controlled trial protocol. *BMC musculoskeletal disorders*, 15: 110, 2014.
49. Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193: 265-275, 1951.
50. Lutzner, J, Hubel, U, Kirschner, S, Gunther, KP, Krummenauer, F: [Long-term results in total knee arthroplasty. A meta-analysis of revision rates and functional outcome]. *Chirurg*, 82: 618-624, 2011.
51. Majetschak, M, Krehmeier, U, Bardenheuer, M, Denz, C, Quintel, M, Voggenreiter, G, Obertacke, U: Extracellular ubiquitin inhibits the TNF-alpha response to

- endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical illness. *Blood*, 101: 1882-1890, 2003.
52. Majetschak, M, Suci, DM, Hasler, K, Obertacke, U, Schade, FU, Jennissen, HP: Cytosolic protein ubiquitylation in normal and endotoxin stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of endotoxin research*, 6: 483-488, 2000.
 53. Mansoor, O, Beaufriere, B, Boirie, Y, Ralliere, C, Taillandier, D, Aurousseau, E, Schoeffler, P, Arnal, M, Attaix, D: Increased mRNA levels for components of the lysosomal, Ca²⁺-activated, and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways in skeletal muscle from head trauma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 2714-2718, 1996.
 54. Mathru, M, Dries, DJ, Barnes, L, Tonino, P, Sukhani, R, Rooney, MW: Tourniquet-induced exsanguination in patients requiring lower limb surgery. An ischemia-reperfusion model of oxidant and antioxidant metabolism. *Anesthesiology*, 84: 14-22, 1996.
 55. Matziolis, D, Perka, C, Hube, R, Matziolis, G: [Influence of tourniquet ischemia on perioperative blood loss after total knee arthroplasty]. *Der Orthopade*, 40: 178-182, 2011.
 56. Meier, WA, Marcus, RL, Dibble, LE, Foreman, KB, Peters, CL, Mizner, RL, LaStayo, PC: The long-term contribution of muscle activation and muscle size to quadriceps weakness following total knee arthroplasty. *J Geriatr Phys Ther*, 32: 79-82, 2009.
 57. Mizner, RL, Petterson, SC, Snyder-Mackler, L: Quadriceps strength and the time course of functional recovery after total knee arthroplasty. *J Orthop Sports Phys Ther*, 35: 424-436, 2005.
 58. Mizner, RL, Snyder-Mackler, L: Altered loading during walking and sit-to-stand is affected by quadriceps weakness after total knee arthroplasty. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 23: 1083-1090, 2005.
 59. Neutzner, M, Neutzner, A: Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. *Essays in biochemistry*, 52: 37-50, 2012.
 60. Ohara, WM, Pedowitz, RA, Oyama, BK, Gershuni, DH: Comparison of functional deficits in the rabbit tibialis anterior following tourniquet ischemia and tourniquet compression. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 14: 626-632, 1996.
 61. Ouellet, D, Moffet, H: Locomotor deficits before and two months after knee arthroplasty. *Arthritis and rheumatism*, 47: 484-493, 2002.
 62. Papalia, R, Zampogna, B, Franceschi, F, Torre, G, Maffulli, N, Denaro, V: Tourniquet in knee surgery. *British medical bulletin*, 2014.

63. Pasiakos, SM, Carbone, JW: Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise. *IUBMB Life*, 66: 478-484, 2014.
64. Patel, MB, Majetschak, M: Distribution and interrelationship of ubiquitin proteasome pathway component activities and ubiquitin pools in various porcine tissues. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 56: 341-350, 2007.
65. Pedowitz, RA, Friden, J, Thornell, LE: Skeletal muscle injury induced by a pneumatic tourniquet: an enzyme- and immunohistochemical study in rabbits. *The Journal of surgical research*, 52: 243-250, 1992.
66. Pedowitz, RA, Gershuni, DH, Friden, J, Garfin, SR, Rydevik, BL, Hargens, AR: Effects of reperfusion intervals on skeletal muscle injury beneath and distal to a pneumatic tourniquet. *The Journal of hand surgery*, 17: 245-255, 1992.
67. Pedowitz, RA, Nordborg, C, Rosenqvist, AL, Rydevik, BL: Nerve function and structure beneath and distal to a pneumatic tourniquet applied to rabbit hindlimbs. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 25: 109-120, 1991.
68. Pedowitz, RA, Rydevik, BL, Gershuni, DH, Hargens, AR: An animal model for the study of neuromuscular injury induced beneath and distal to a pneumatic tourniquet. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 8: 899-908, 1990.
69. Pereira, C, Murphy, K, Jeschke, M, Herndon, DN: Post burn muscle wasting and the effects of treatments. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37: 1948-1961, 2005.
70. Pickart, CM: Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11: 1055-1066, 1997.
71. Ponelies, N, Gosenca, D, Ising, N, Schoen, M, Ruppel, K, Vollmar, B, Obertacke, U: Effects on the ubiquitin proteasome system after closed soft-tissue trauma in rat skeletal muscle. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 37: 645-654, 2011.
72. Ponelies, N, Hirsch, T, Krehmeier, U, Denz, C, Patel, MB, Majetschak, M: Cytosolic ubiquitin and ubiquitylation rates in human peripheral blood mononuclear cells during sepsis. *Shock*, 24: 20-25, 2005.
73. Przygodda, F, Manfredi, LH, Machado, J, Goncalves, DAP, Zanon, NM, Bonagamba, LGH, Machado, BH, Kettelhut, IC, Navegantes, LCC: Acute intermittent hypoxia in rats activates muscle proteolytic pathways through a glucocorticoid-dependent mechanism. *Journal of applied physiology*, 122: 1114-1124, 2017.
74. Ratchford, SM, Bailey, AN, Senesac, HA, Hocker, AD, Smolkowski, K, Lantz, BA, Jewett, BA, Gilbert, JS, Dreyer, HC: Proteins regulating cap-dependent translation

- are downregulated during total knee arthroplasty. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*, 302: R702-711, 2012.
75. Richly, H, Rape, M, Braun, S, Rumpf, S, Hoege, C, Jentsch, S: A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, 120: 73-84, 2005.
 76. Rorabeck, CH, Kennedy, JC: Tourniquet-induced nerve ischemia complicating knee ligament surgery. *The American journal of sports medicine*, 8: 98-102, 1980.
 77. Ruchholtz, S, Wirtz, D.C.: *Orthopädie und Unfallchirurgie essentials - Intensivkurs zur Weiterbildung*, 2.Auflage, Stuttgart, Thieme, 2012, pp. 547-552.
 78. Sandri, M: Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45: 2121-2129, 2013.
 79. Schakman, O, Kalista, S, Barbe, C, Loumaye, A, Thissen, JP: Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45: 2163-2172, 2013.
 80. Scharf, H-P, Rüter, A.: *Orthopädie und Unfallchirurgie – Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung*, 2.Auflage, München, Urban&Fischer, 2011, pp. 826- 829.
 81. Schoen, M, Rotter, R, Gierer, P, Gradl, G, Strauss, U, Jonas, L, Mittlmeier, T, Vollmar, B: Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *The Journal of trauma*, 63: 788-797, 2007.
 82. Seiffert, M, Gosenca, D, Ponelies, N, Ising, N, Patel, MB, Obertacke, U, Majetschak, M: Regulation of the ubiquitin proteasome system in mechanically injured human skeletal muscle. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 56: 227-233, 2007.
 83. Sjöholm, H, Gidlof, A, Larsson, J, Sahlin, K: The effect of long-term circulatory occlusion on pH and energy metabolism of the quadriceps muscle in man. *Clinical science*, 68: 597-600, 1985.
 84. Smith, TO, Hing, CB: Is a tourniquet beneficial in total knee replacement surgery? A meta-analysis and systematic review. *The Knee*, 17: 141-147, 2010.
 85. Tai, TW, Lin, CJ, Jou, IM, Chang, CW, Lai, KA, Yang, CY: Tourniquet use in total knee arthroplasty: a meta-analysis. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 19: 1121-1130, 2011.
 86. Thrower, JS, Hoffman, L, Rechsteiner, M, Pickart, CM: Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19: 94-102, 2000.

87. Tu, H, Zhang, D, Corrick, RM, Muelleman, RL, Wadman, MC, Li, YL: Morphological Regeneration and Functional Recovery of Neuromuscular Junctions after Tourniquet-Induced Injuries in Mouse Hindlimb. *Front Physiol*, 8: 207, 2017.
88. Walsh, M, Woodhouse, LJ, Thomas, SG, Finch, E: Physical impairments and functional limitations: a comparison of individuals 1 year after total knee arthroplasty with control subjects. *Phys Ther*, 78: 248-258, 1998.
89. Wenzel, DM, Stoll, KE, Klevit, RE: E2s: structurally economical and functionally replete. *The Biochemical journal*, 433: 31-42, 2011.
90. Westman, B, Weidenhielm, L, Rooyackers, O, Fredriksson, K, Wernerman, J, Hammarqvist, F: Knee replacement surgery as a human clinical model of the effects of ischaemia/reperfusion upon skeletal muscle. *Clinical science*, 113: 313-318, 2007.
91. Wiborg, O, Pedersen, MS, Wind, A, Berglund, LE, Marcker, KA, Vuust, J: The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J*, 4: 755-759, 1985.
92. Wilkinson, KD: Cell biology: unchaining the condemned. *Nature*, 419: 351-353, 2002.
93. Wing, SS: Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37: 2075-2087, 2005.
94. Wirtz, DC: *AE-Manual der Endoprothetik – Knie*, Heidelberg Dordrecht London New York, Springer, 2011, pp. 85-86, 130-132, 195-202.
95. Wray, CJ, Mammen, JM, Hershko, DD, Hasselgren, PO: Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35: 698-705, 2003.
96. Yi, S, Tan, J, Chen, C, Chen, H, Huang, W: The use of pneumatic tourniquet in total knee arthroplasty: a meta-analysis. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 134: 1469-1476, 2014.
97. Yoshida, Y, Mizner, RL, Ramsey, DK, Snyder-Mackler, L: Examining outcomes from total knee arthroplasty and the relationship between quadriceps strength and knee function over time. *Clinical biomechanics*, 23: 320-328, 2008.
98. Zhang, W, Li, N, Chen, S, Tan, Y, Al-Aidaros, M, Chen, L: The effects of a tourniquet used in total knee arthroplasty: a meta-analysis. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 9: 13, 2014.
99. Zhang, W, Liu, A, Hu, D, Tan, Y, Al-Aidaros, M, Pan, Z: Effects of the timing of tourniquet release in cemented total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 9: 125, 2014.

8 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Ahmed Jawhar, Stephan Hermanns, Norbert Ponelies, Udo Obertacke, Henning Roehl

Tourniquet-induced ischaemia during total knee arthroplasty results in higher proteolytic activities within vastus medialis cells: a randomized clinical trial.

Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2016 Oct;24(10):3313-3321.

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name:	Stephan Hermanns
Geburtsdatum:	02.06.1989
Geburtsort:	Rosenheim
Familienstand:	Verheiratet
Vater:	Hans-Josef Hermanns
Mutter:	Dr. med. Elisabeth Thurner-Hermanns

SCHULISCHER WERDEGANG

1995 – 1999	Otfried-Preußler-Grundschule in Stephanskirchen
1999 – 2008	Finsterwalder Gymnasium in Rosenheim
27.06.2008	Allgemeine Hochschulreife

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

07.09.2009	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Semmelweis Universität Budapest
04.07.2011	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.09.2011	Fortführung des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
09.10.2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12.11.2015	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.11.2015	Approbation als Arzt

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertationsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn **Prof. Dr. med. Udo Obertacke MME**, meinem Doktorvater und stellvertretenden Klinikdirektor des Orthopädisch-Unfallchirurgischen Zentrums (OUZ) der Universitätsmedizin Mannheim, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Für die hervorragende Betreuung samt zahlreicher wertvoller Anmerkungen und Ratschläge, sowie das mühevollen Korrekturlesen und die Anfertigung des Erstgutachtens möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Herrn **Dr. rer. nat. Norbert Ponelies** danke ich für die professionelle Einführung in sämtliche laborchemischen Untersuchungsverfahren, sowie die kritischen, äußerst konstruktiven und wertvollen inhaltlichen Anmerkungen bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit. Besonders bedanke ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv, professionell und warmherzig begleitet.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn **Dr. med. Ahmed Jawhar** für die ausgezeichnete Betreuung. Bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit gewährte er mir stets außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen **Eltern** möchte ich besonders herzlich danken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung und dass Sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten. Ohne Sie wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Ehefrau **Assess. jur. Anja Hermanns** für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während meines Studiums und meiner Promotion.